

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

***Escherichia coli* produktsiooni mõõtmise limiteeritud toitainetega söötmetel**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Koit Kõrgnurm

Juhendaja vanemteadur Arvi Jõers

TARTU 2020

SISUKORD

INFOLEHT	5
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	7
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1.Tööstuslik mikrobioloogia	8
1.2. <i>In silico</i> mudelid metabolismiradade loomiseks	8
1.2.1. <i>In silico</i> mudelid metabolismiraja leidmiseks	9
1.2.2. <i>In silico</i> mudelid metabolismiraja optimeerimiseks- MuSIC	9
1.3.Mikroobitüve konstruktsioon	10
1.3.1.Peremehe valik.....	10
1.3.1.1. <i>Corynebacterium glutamicum</i> peremeesorganismina	10
1.3.1.2.Halofiilid peremeesorganismina.....	11
1.3.2.Heteroloogne ekspressioon	12
1.3.3.Tolerantsi tõstmine	12
1.3.4.Toksiliste vaheühendite reguleerimine.....	13
1.3.4.1.Toksiliste produktide reguleerimine: Kahe keemilise faasi kasutamine	14
1.3.5.Negatiivse regulatsiooni eemaldamine.....	15
1.3.6.Kofaktorite voolu optimeerimine	15
1.3.7.Prekursorite voolu optimeerimine	16
1.3.7.1.„Lüka-tõmba-blokeeri“ strateegia	16
1.3.7.2.Prekursorite voolu optimeerimine lükopeeni näitel	17
1.4.Mikroobi kasvatuse protsessid	18
1.4.1.Söötmed	18

1.4.2.Kasvatusprotsessid	19
1.4.3.Reaktorite mahu suurendamine ehk skaleerimine	20
1.4.3.1.Optimaalsete tingimuste säilitamine	20
1.4.3.2.Induktsioonsüsteemid	21
1.4.3.3.Mutandid bioreaktoris	22
1.5.Kasvu ja produktsiooni dilemma	22
1.5.1.Toitainete limiteerimine	23
1.5.2.Süntetilised meetodid	24
2.EKSPERIMENTAALNE OSA	26
2.1.Töö eesmärgid	26
2.2.Materjalid ja metoodika	27
2.2.1.Bakteritüved ja plasmiidid	27
2.2.2.Kompetentsed rakud ja plasmidi transformatsioon	27
2.2.3.Söötmed	27
2.2.4. <i>E. coli</i> bAJ-25 tootlikuse mõõtmise katse ülesehitus	28
2.2.5.Lükopeeni kontsentratsiooni mõõtmine	28
2.2.6.Ohutuspõhised	28
2.3.Tulemused	29
2.3.1.Teiste teadlaste kirjeldatud meetodite kasutamine	29
2.3.1.1.Lükopeeni kontsentratsiooni mõõtmine polüpropüleenist 96 kannuga mikroitiiterplaadil	29
2.3.1.2.Lükopeeni lahustite testimine	30
2.3.1.3.Lükopeeni tuvastamine madalatel kontsentratsioonidel	31
2.3.1.4.Lükopeeni tuvastamine suuremate ruumaladega proovidest.	31
2.3.1.5.DMSO neeldumise mõõtmine suurema ruumala puhul	32
2.3.1.5.1.Lükopeeni lagunemine ajas DMSO suspensioonis valguse käes	32

2.3.2.Lükopeeni koguse mõõtmise protokoll.....	33
2.3.3.Kasvutingimuste optimeerimine	34
2.3.4.Lükopeeni taseme mõõtmised erinevatel toitainete kontsentratsioonidel	36
2.3.4.1.Lükopeeni produktsiooni hindamine lämmastiku ja fosfori limiteerimisel.....	36
2.3.4.2.Lükopeeni produktsioon biomassi kohta limitatsiooniga söötmetel	36
2.3.4.3.Lükopeeni tiiter limitatsioonidega söötmetel	37
2.3.5.Lükopeeni produktsiooni hindamine glükoosi ülekülluses	38
2.3.5.1.Glükoosi ja teiste metaboliitide analüüs	39
2.4.Arutelu	41
KOKKUVÕTE	43
SUMMARY	44
KASUTATUD KIRJANDUS	45
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	48
LISAD.....	49
LIHTLITSENTS.....	50

INFOLEHT

***Escherichia coli* produktsiooni mõõtmine limiteeritud toitainetega söötmetel**

Mikroobide abil on võimalik sünteesida paljusid erinevaidprodukte. Selleks, et nende produktide tootmine ka majanduslikult kasulik oleks, tuleb mikroobid optimeerida oma produkti võimalikult efektiivselt tootma. Tüve optimeerimiseks on ainevahetuse inseneerias mitmeid lähenemisi. Üks lähenemine on kultuuri kasvu peatamine, et suunata rohkem söötme substraate produkti sünteesiks.

Töö eesmärk oli leida madalmolekulaarse ühendi tootmise hindamiseks sobiv mudel ja selle abil hinnata, kas lämmastiku või fosfori limitatsiooniga ning suurendatud glükoosi kontsentratsiooniga söötmetel on võimalik suurendada *E. coli* tootlikust.

Märksõnad: *Escherichia coli*, lükopeen, limitatsiooniga söötmed, tööstuslik mikrobioloogia

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The production of *Escherichia coli* in a limited nutrient media

Microbes can be used to synthesise wide variety of products. In order to make the synthesis profitable, it is necessary to optimise the strain to create the product as effectively as possible. There are many approaches in metabolic engineering to optimise a strain. One of these approaches is to stop the growth of the culture to direct more of the substrate towards the product synthesis.

The aim of this thesis is to find a model to characterize low-molecular compound production and use it to find out whether it is possible to increase the productivity of *E. coli*, using nitrogen- or phosphorus-limited or glucose-enriched medium.

Keywords: *Echerichia coli*, lycopene, limited medium, industrial microbiology

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

KASUTATUD LÜHENDID

LB- *lysogeni broth* sööde

MOPS- morfolinopropaan sulfonaat

DMSO- dimetüül sulfooksiid

IPP- isopentenüül difosfaat

DMAPP- dimetüülallüül difosfaat

HMBPP- hüdroksümetüülbutenüül difosfaat

PE- fosforüületanoolamiin

PG- fosfatidüülglütserool

CL- kardiolipiin

2-PE- 2-fenüületanool

2-PEAc- 2- fenüületüülatsetaat

DXP- 1-desoksü-D-ksülluloos-5-fosfaat

G3P- Glütseeraldehüüd-3-fosfaat

PEP- fosfoenoolpüruvaat

G6P- glükoos-6-fosfaat

1,3PDO- 1,3-propaandiool

α KG- α - ketoglutaraat

SISSEJUHATUS

Tööstuslikus mikrobioloogias kasutatavad mikroobid on juba aastasadu inimkonnale väärtprodukte loonud. Kaasaegsete sünteetilise bioloogia tööriistadega on võimalik luua täiesti uute metabolismiradadega mikroobitüvesid. Seega on mikroobide abil võimalik toota väga erinevaidprodukte, mida on siiani keemiliselt sünteesitud. Kuid vaid väheste produktide tootmine on majanduslikult kasulik. Uued metabolismirajad muudavad mitmeid peremeesraku siseseid protsesse, mistõttu võib uus metabolismirada viia paigast peremeesraku homöostaasi. Võimalikult efektiivse tootmise jaoks peab tüvesid optimeerima. Tööstuses hakatakse tüve kasutama alles siis, kui selle produkti sünteesimine on nii hästi optimeeritud, et selle abil suudetakse majanduslikku kasumit luua.

Bioreaktorisse sisestatud substraat konverteeritakse kas biomassiks, kõrvalproduktiks või soovitud produktiks. Üks meetod substraadist efektiivsemalt produkti sünteesimiseks on kultuuri kasvu reguleerimine. Kõige lihtsam ja levinum viis on reguleerida kasvu substraatide piiramisega kasvukeskkonnas. Söötimest lõppeb mõni kasvuks vajalik molekul, kuid produkti substraate leidub kasvukeskkonnas jätkuvalt.

Töö teoreetilises osas antakse ülevaade bakteritüve loomisest ja selle produktsiooni optimeerimiseks kasutatavatest meetoditest. Nende juurde tuuakse näiteid kuidas on meetodeid kasutades mikroobide produktsiooni suurendatud.

Töö praktilises osas töötati välja lükopeeni kontsentratsiooni mõõtmise protokoll. Seda kasutades uuriti, kas lükopeeni tootva *Escherichia coli* puhul on võimalik suurendada lükopeeni kontsentratsiooni, peatades bakterite kasvu madalama lämmastiku või fosfori kontsentratsiooniga söötmel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Tööstuslik mikrobioloogia

Tööstuslik mikrobioloogia on tegevusala ja rakendusteaduse haru, mis tegeleb mikrobioloogiliste protsesside abil mitmesuguste ainete ja toodete tootmisega. Selle alla mahuvad nii toiduainetetööstuse protsessid (hapupiim, juust jne) kui ka keemia- ja farmaatsiatööstusele vajalike ainete tootmine (piimhape, etanool biokütuseks, antibiootikumid jne).

Traditsioonilise biotehnoloogia osana on tööstuslikus biotehnoloogias kasutanud loodusest eraldatud mikroobitüvesid, mis on välja valitud juba olemasolevate omaduste põhjal. Viimase paarikümne aasta jooksul on aga jõudsalt suurenenud selliste tüvede osakaal, milles on kuntslikult suurendatud või loodud uusi metaboolseid radasid soovitud ainete tootmiseks. Sellist lähenemist nimetatakse ainevahetuse inseneerimiseks (*metabolic engineering*), mille arenguks on suure tõuke andnud insenerigeneetika ja sünteetilise bioloogia areng. Selline lähenemine võimaldab luua täiesti uusi ühendeid tootvaid mikroobitüvesid.

Uue tüve loomine on keerukas ja mitme-etapiline protsess, kus peab arvestama paljude teguritega. Arvesse tuleb võtta nii mikroobitüve konstrueerimist, selle kasvatamist kui ka produkti puhastamist. Tüve konstrueerimine koosneb peremehe valikust, metabolismiraja loomisest, tolerantsi arendamisest, negatiivse regulatsiooni eemaldamisest ja prekursorite ja kofaktorite voolu optimeerimisest. Kasvatamise käigus tuleb valida süsinikuallikas, söötme koostis, aereerimine, hinnata tootlikust, valida bioreaktori tüüp ning suurendada reaktorite mahtu ehk skaleerida. Peale kasvu lõppu tuleb produkt eraldada, puhastada ning vajadusel ka keemiliselt modifitseerida (Lee ja Kim, 2015).

Järgnevalt annan ülevaate uue tootmistüve konstrueerimise ja selle optimeerimise erinevatest etappidest.

1.2. *In silico* mudelid metabolismiradade loomiseks

Selleks, et uut projekti võimalikult efektiivselt alustada, tuleks esmalt modelleerida sünteesi matemaatiliste mudelite abil. Mikroobide metabolismi disainimine on väga töömahukas ja kõikide variantide vahel kompromisside kaalumiseega on inimhõlpsusel raskusi. On loodud mitmeid *in silico* mudeleid, mis aitavad leida optimaalseima viisi soovitud produkti sünteesimiseks.

Retrobiosünteesiks nimetatakse lähenemist, mille käigus alustatakse sünteesiraja disaini viimasest reaktsioonist, mille tulemusena tekib lõpp-produkt. Seejärel disainitakse eelviimane ja nii edasi kuni keskse ainevahetuse komponentideni välja. Selline lähenemine loob palju võimalikke paralleelradu ja nende võrdlemiseks on matemaatilised mudelid hädavajalikud. Uusi metabolismi radasid saab luua ka manuaalselt, kuid sellise lähenemisega ei võetaks arvesse kõiki võimalusi ja kõige optimaalsema väljaselgitamine võtaks kaua aega. Seega on *in silico* mudelid äärmiselt kasulikud (Hadadi ja Hatzimanikatis, 2015).

Kõige levinumad *in silico* uute metabolismiradade generaatorid jagunevad kahe klassi: 1) Andmebaasis olevate reaktsioonide kombineerimise põhised 2) *De novo* radade loojad hüpoteetilisi teadmisi kasutades.

1.2.1. *In silico* mudelid metabolismiraja leidmiseks

Retrobiosünteesiliste matemaatiliste mudelite abil leitakse kõik võimalikud reaktsioonid produkti saamiseks. Paljud neist ei saa looduses üldse esineda. Seega kasutatakse mehhanismi, mille abil metabolismiradasid hinnata, et ebasobivad elimineerida. Esmalt toimub kvalitatiivne kärpimine, mille käigus võrreldakse, kui sarnane on uus rada juba teadaolevate reaktsioonidega. Järgmises etapis toimub kvantitatiivne kärpimine, kus hinnatakse metabolismiradade mõju raku elulemusele ja produktsioonile, et valida välja kõige tõenäolisemalt töötavad metabolismi rajad. Eelmainitud analüüside tulemusel antakse radadele skoorid, mille alusel selgitatakse välja kõige suurema tõenäosusega töötavad metabolismirajad. Skoorimisel saab asetada rõhku erinevatele aspektidele, näiteks anda suurem kaal produktsioonile või väiksem kaal geneetilisi muudatusi nõudvatele radadele (Hadadi ja Hatzimanikatis, 2015).

1.2.2. *In silico* mudelid metabolismiraja optimeerimiseks- MuSIC

Lisaks *de novo* metabolismiradade loomisele saab matemaatilisi mudeleid kasutada ka mikrobiaalse produktsiooni optimeerimiseks. Üks *in silico* produktsiooni hindamise programmidest on **MuSIC** ehk *Multi-scale framework for modeling Sustainable Industrial Chemicals production*. MuSICu kõige suurem väärtus on erinevate protsessi osade vahelise optimaalse koostöö loomine jätkusuutliku tootmise optimeerimiseks. MuSIC kombineerib juba olemasolevaid programme, näiteks metaboolse inseneeria tööriista FRAMED, võrgusliku (*network*) optimeerimise tööriista GUROBI ja differentiaalvõrrandi lahendajat SciPy VODE.

Selle abil on võimalik modelleerida raku metabolismi, disainida bioraktorit, analüüsida enne ja pärast sünteesi toimuvaid protsesse ja hinnata nende majandusliku mõju (Zhuang ja Herrgård, 2015).

MuSIC loodi Zhuangi ja Herrgårdi poolt aastal 2015 ja nende avaldatud töös toodi ka MuSICu abil optimeeritud bioprotsessi näide. Nad testisid läbi 2 produkti (1,3-propaandiooli ja 3-hüdroksüpropaanhappe), 2 peremeest (*Escherichia coli* ja *Saccharomyces cerevisiae*), 66 metabolismi rada, 2 süsinikuallika päritolu (mais ja sojauba), 2 vahesubstraati (glükoos ja glütserool), 3 tööstuslikku sektorit (põllumajandus, energia ja biokeemia), 4 loodusressurssi (maa, nafta, maagaasi ja kivisüsi) ja 5 jääkainet (CO₂, PO₄, tselluloos, erinevad orgaanilised jäätmed ja kips). Tulemuseks said nad suure hulga erinevaid stsenaariume, kuidas 1,3-propaandiooli või 3-hüdroksüpropaanhappe tootmist optimeerida ja mis on nende tagajärjed. Näiteks 3-hüdroksüpropaanhappe tootmine toodaks suuremat kasumit biokeemia sektorile, tekitaks vähem CO₂ ja PO₄ reostust, kuid oleks kulukam põllumajandussektorile kui 1,3-propaandiooli tootmine.

1.3. Mikroobitüve konstruktsioon

1.3.1. Peremehe valik

Üks tähtsamaid mikroobitüve konstruktsiooni etappe on peremehe valik. Kogu produktsioon toimub peremeesraku sees ja seega peab hoolikalt jälgima selle omadusi ja eripärasid. Sagedasti kasutatud peremeesorganismid mikrobioloogias on *E. coli* ja *S. cerevisiae*. Tuntud peremeesorganismi kasutamise eelis on selle põhjalik kirjeldatus ja neid on lihtsam geneetiliselt modifitseerida. Sünteesiraja peremeheks ei pea aga alati olema *E. coli* või *S. cerevisiae*. Mikroobid on väga mitmekesised ja teatud eriliste omaduste tõttu võiks eelistada ka vähemtuntud peremeesorganisme. Osad organismid omavad juba naturaalselt tööstuslikku mikrobioloogiat huvitava produkti metabolismirada, näiteks piimhappebakterid. Lisaks on mikroorganismide optimaalsed kasvutingimised erinevad, eelistades ekstreemsemat pH-d, temperatuuri või suuremat soolakontsentratsiooni.

1.3.1.1. *Corynebacterium glutamicum* peremeesorganismina

Corynebacterium glutamicum on kasutatud L-glutamiinhappe tootmiseks juba 1950. aastast. *Corynebacterium* perekonna bakteritega toodetakse veel L-lüsiini, L-valiini, L-asparagiinhapet ja

palju teisi aminohappeid. Üks enimkasutatud *C. glutamicum* produkte on L-lüsiin, mida kasutatakse nii farmiloomade toidulisandina kui ka farmaatsiatööstuses (Hermann, 2003).

C. glutamicum on tõhusamaks muudetud mitmete geneetiliste muundamistega. Homoseriini auksotroofset *C. glutamicum* tüve ATCC13287 kasutades suudeti lüsiini konversiooni saagist tõsta 26%-ni. Tüve muundati veel edasi, et see oleks auksotroof veel ühe aminohappe, vitamiinide ja antimetaboliitide suhtes ja saavutati konversiooni saagis 50% (Pfefferle jt., 2003).

1.3.1.2. Halofiilid peremeesorganismina

Mikrobioloogiliseks tootmiseks saab kasutada ka halofiilseid ehk soolalembelisi organisme. Halofiilsed organismid taluvad ja sageli vajavad kasvukeskkonnast soola. Seetõttu ei pea söötmes kasutama magevett. Halofiilid taluvad sageli ka aluselist pH-d. Aluselises ja soolases keskkonnas ei ole vaja steriilsusele nii suurt tähelepanu pöörata, sest saastumine on ebatõenäoline.

Hiinast Xinjiaangi soolajärvest isoleeriti bakteritüvi *Halomonas TD01*. Sellel kirjeldati polü(3-hüdroksübutüraadi) (PHB) tootmist. PHB-st saab toota näiteks plastiku ja teisi mahtkemikaale (*bulk chemicals*). *Halomonas TD01* suutis toota raku kuivamassist 89% PHB-d. Kasutati kaheastmelist kultivatsiooni, limiteeritud lämmastikuallikat, ebasteriilset ning avatud bioreaktorit (Tan jt., 2011).

Sama uurimisgrupp uuris *Halomonas TD01* geneetiliselt muundamise võimalusi, et toota PHB asemel polü(3-hüdroksübutüraat-ko-3-hüdroksüvaleraati) (PHBV) otse suhkrutest. PHBV on sarnane kahe liitunud PHB molekuliga ja seda saab samuti polümeeride tootmiseks kasutada. PHBV-l on paremad omadused tööstuses käsitlemiseks. *Halomonas TD* tüvede probleemiks on plasmiidide ebastabiilsus, madal konjugatsiooni efektiivsus ja indutseeritava süsteemi puudumine. Töö tulemusena inaktiveeriti osaliselt DNA restriksiooni ja metülatiooni süsteem, mis aitas kaasa võõra plasmidi stabiilsusele. Uus tüvi sai nime *Halomonas TD08*, selles oli elimineeritud 4 geeni, mis suurendas PHBV tootlikust. Uus tüvi oli mõõtnetelt suurem, mis soodustas sadestumist ja omakorda alandas produkti puhastamise kulu (Tan jt., 2014).

Kui bioreaktoris toodetakse orgaanilist hapet, siis on mõistlik kasutada madalat pH-d taluvat peremeesorganismi, näiteks pärme või naturalseid piimhappebaktereid. Sel juhul ei pea kulutama ressursse söötme neutraliseerimisele puhvritega. Madalamal pH-l opereerimine vähendab bakteriaalse saastumise tõenäosust (Borodina jt., 2015).

1.3.2. Heteroloogne ekspressioon

Meid huvitava produkti metabolismirada võib juba mikroobis olemas olla. Kuid kui soovitakse sünteesida midagi looduses mitte esinevat või viia metabolismirada üle mõnesse teise peremeesorganismi, tuleb mikroobis kasutada heteroloogset ekspressiooni, ehk ekspresseerida teistest organismidest pärit DNAd. Heteroloogset ekspressiooni on aina lihtsam läbi viia, sest DNA süntees ja sekveneerimine läheb järjest odavamaks, kiiremaks ja täpsemaks. Organismidel on erinevad transkriptsiooni ja translatsiooni initseerimise mehhanismid ja nendega seotud kontrolljärjestused. Sisestatud geeni kodeeriv järjestus võib olla uus, aga reguleerivad alad, nagu promootor ja Shine- Dalgarno järjestus, peavad olema mikroobile omased. Seetõttu on lihtsam kasutada heteroloogseks ekspressiooniks omavahel lähedasi tüvesid. Eriti palju peab muutma eukarüootide geene, et neid prokarüootides ekspresseerida. Eukarüootide geenid sisaldavad introneid, mille splaissimisvõime prokarüootides puudub. Lisaks on osadel eukarüootide geenidel valgu signaaljärjestused spetsiifiliseks lokatsiooniks rakus. Need järjestused tuleb enne bakterites ekspresseerimist eemaldada.

Heteroloogse geeni koodonikasutus ja GC-sisaldus võivad samuti erineda retsiipiendi omast. Koodonikasutuse optimeerimist läbi viies on võimalik geeni ekspressioonitaset oluliselt tõsta.

1.3.3. Tolerantsi tõstmine

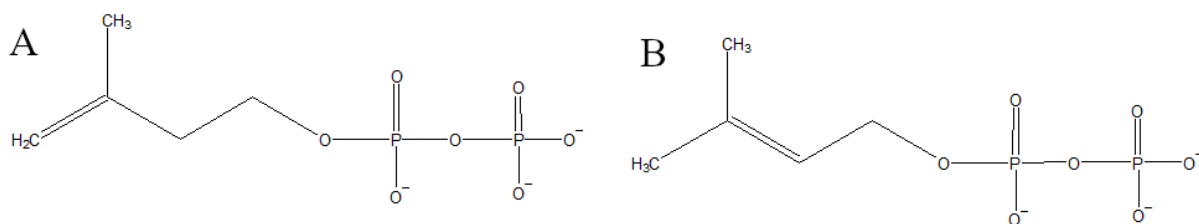
Kui mikroob toodab enda jaoks täiesti uut ühendit või omase ühendi produktsioon on kunstlikult suurendatud, võib toodetud produkt hakata piirama raku elutegevust. Kindlasti tuleb jälgida rakkude tolerantsi toodetud produkti kui ka vaheühendite suhtes.

Paljude toksiliste ainete sihtmärgiks on raku membraan. Kui barjäär raku sise- ja väliskeskkonna vahel saab kannatada, läheb paigast ionide kontsentratsioon ja seiskub ATP tootmine. *E. coli* membraan koosseiselt peamiselt kolmest fosfolipiidist: fosfatidüületanolamiin (PE), fosfatidüülglütserool (PG) ja kardiolipiin (CL). Tan jt. 2017 uurisid nende kolme fosfolipiidi kontsentratsioonide mõju raku tolerantsile membraane läbivate kemikaalide suhtes. Selgus, et fosfatidüülseriini süntetaasi geeni *pssA* ekspressiooni suurendades leidis membraanis rohkem PE-d. PE fosfolipiidide rasvhapete süsinikuahelad olid pikemad, rohkem küllastunud, sisaldasid vähem tsikleid ja olid vähenenud hüdrofoobsusega. Selle tulemusena suurenes rakkude taluvus furfurooli, atsetaadi, oktaanhappe, tolueeni, etanooli ja madala pH suhtes (Tan jt., 2017).

1.3.4. Toksiliste vaheühendite reguleerimine

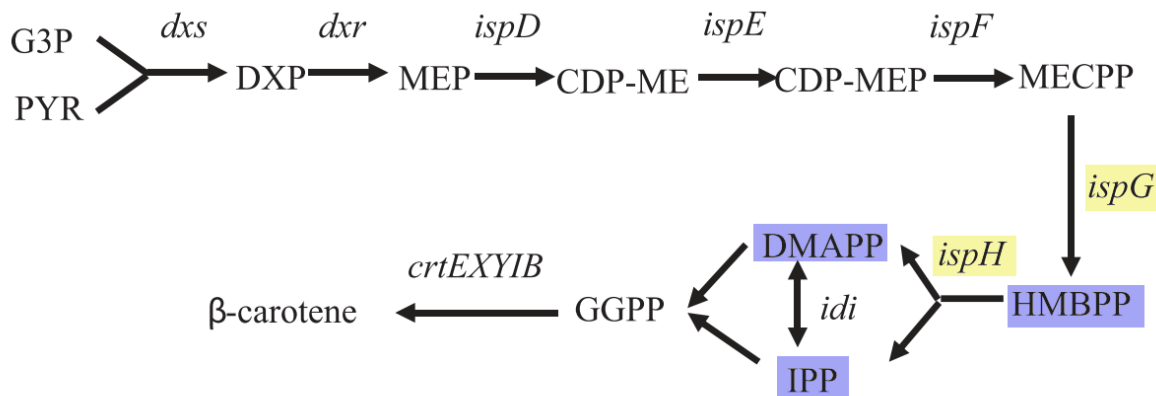
Metabolismiraja vaheühendid võivad samuti olla toksilised. Looduslikult esinevates mikroobides ei mängi toksilised vaheühendid eriti suurt rolli, sest evolutsiooni käigus on ensüümide aktiivsused optimaalselt reguleeritud. Kui aga looduslikust tasemest kõrgemalt ekspresseerida mõnda uut või natiivset ensüümi, võib kuhjuv vaheprodukt olla toksiline ja vähendada raku elulemust.

Isoprenoidid on mitmekesine polümeersete süsivesikute klass, mis koosnevad viiesüsinikulistest monomeeridest ehk isopreenidest: isopentenüül difosfaadist (IPP) (joonis 1 A) ja dimetüülallüül difosfaadist (DMAPP) (joonis 1 B). Isopreenide metabolismirajas tekib rakkudes mürgine vaheühend hüdroksümetüülbutenüül difosfaat (HMBPP).



Joonis 1. A. Isopentenüül difosfaat ja B. Dimetüülallüül difosfaat

Karoteenide prekursorid on isoprenoidid. Karoteenide hulka kuuluvad näiteks β -karoteen ja ka selle töö eksperimentaalses osas kasutatud lükopeen. Karoteenide metabolismiraja joonis *E. coli*s (joonis 2).



Joonis 2. β - karoteeni metabolismis osalevad ensüümide geenid ja vahemetaboliidid *E. coli*s (Li jt., 2017). Selles töös tähtsaimad ensüümide geenid on (kollastes kastides) *ispG* ja *ispH* ja tähtsamad vahemetaboliidid (sinistes kastides) HMBPP, DMAPP ja IPP.

Li jt., 2017 üritasid oma töös suurendada *E. coli* isoprenoidide, lükopeeni ja β - karoteeni tootlikust. Kõrge isoprenoidide saagise jaoks peab optimeerima prekursorite ehk eellasmolekulide voolu. Neid toodetakse *E. coli*s 2-C-metüül-d-erüttool-4-fosfaadi (MEP) rajas. MEP raja geenide *dxr*, *ispD*, *ispE*, *ispG* ja *ispH* ekspressiooni taset modifitseerides on üritatud suurendada isoprenoidide sünteesi. Selgus, et *ispG* üle ekspresseerides akumulereerus rakkudele toksiline hüdroksümetüülbutenüül difosfaat (HMBPP). HMBPP sekkub nukleotiidide ja valkude sünteesi mehhanismi, vähendades seeläbi kultuuri kasvu ja isoprenoidide tootmist. Kui aga suurendati ka *ispH* geeni ekspressiooni, mis on *ispG*-st allavoolu (joonis 2), tarvitati HMBPP ära enne kui see rakkudele kahjulikult mõjuda sai. *ispG* ja *ispH* ekspressiooni koordineeritult reguleerides tõsteti β -karoteeni tiitrit 73% ja lükopeeni tiitrit 77% võrreldes *ispG* ja *ispH* optimeerimata tüvedega (Li jt., 2017).

1.3.4.1. Toksiliste produktide reguleerimine: Kahe keemilise faasi kasutamine

Bioreaktoris kogunev produkt võib suurtes kontsentratsioonides olla kultuurile kahjulik. Sellega tegelemiseks peab suurendama mikroobide taluvust või produkti eemaldama. ISPR ehk *in situ product recovery* on meetod, kus produkti eemaldatakse sünteesi ajal. Üks strateegia on kasutada bioreaktoris kahte faasi: vesi- ja orgaanilist faasi. *Batch* ja *fed-batch* kultuurides akumulereub toksiline produkt kasvukeskkonda ja hakkab kasvu peatama. Kui bioreaktoris on eraldi

vesikeskkond, kus mikroobid kasvavad ja orgaaniline faas, kus eraldunud ained lahustuvad, on toksiline produkt mikroobidest eristatud. Seega saavad mikroobid paljuneda ja soovitud produkti toota nii, et toksiline produkt nende elulemust ei piiraks (Etschmann ja Schrader, 2006).

Orgaanilise faasi aine valimisel tuleks arvesse võtta, et see oleks madala viskkoossusega, mittepõlev, keemiliselt stabiilne ja soovitud produkt lahustuks selles hästi. Stark jt., 2002 uurisid 2- fenüületanooli (2-PE) tootmist kahefaasilises protsessis *Saccharomyces cerevisiae*s. Nad testisid üle 300 orgaanilise faasi aine ja otsustasid oleiinhappe kasuks.

Etschmann ja Schrader kirjeldasid samuti 2- fenüületanooli (2-PE) ja 2- fenüületüülatsetaadi (2-PEAc) tootmist. Nad kasutasid peremeesorganismi *Kluyveromyces marxianus* ja orgaanilise faasina propüleen glükooli (PPG) 1200. Saavutati sarnane tiiter (26,5g/l) Stark jt. 2002 artikliga. Ometi võrreldes oleiinhappega jättis PPG 1200 7 korda vähem pärmidele mürgist 2-PEd vesifaasi (Etschmann ja Schrader, 2006).

1.3.5. Negatiivse regulatsiooni eemaldamine

Negatiivne tagasiside on mehhanism, mille läbi tuvastatakse raku sees olevate ühendite kontsentratsioon ja teatud koguse korral peatatakse nende ühendite produktsioon. Evolutsiooni käigus on see arenenud ja täienenud miljoneid aastaid, et mikroob mõnda ühendit üle ei produtseeriks ja seeläbi enda kohasust ei vähendaks. Mikrobioloogilise produktsiooni optimeerimise käigus tuleb produktiga seotud negatiivne tagasiside eemaldada, muidu hakkab produkti kuhjumine selle sünteesi inhibeerima.

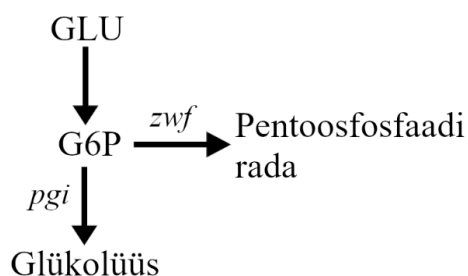
Park jt. 2014 kirjeldavad oma töös L-arginiini tootmise optimeerimist *Corynebacterium glutamicum*s. Üheks etapiks oli ka arginiini operoni negatiivse regulatsiooni eemaldamine. Nad tegid *knock-out* tüve, kus puudusid geenid *argR* ja *farR*. ArgR kinnitub kõrge arginiini kontsentratsiooni puhul arginiini operonile ja seega represseerib arginiini sünteesi. FarR represseerib L- arginiini prekursoreid tootvaid enüüme: *argB*, *argC*, *argG*, *argH*, *gdh* ja *pgl*. Saadud *knock-out* tüvi tootis arginiini katseklaasis tiitriga 61.9g/l, mis oli ilma *knock-out*ideta tüvest kõrgem (Park jt., 2014).

1.3.6. Kofaktorite voolu optimeerimine

Rakk kasutab oma ainevahetuses mitmesuguseid kofaktoreid, nagu nikotiinamiid adeniin dinukleotiid (NAD), nikotiinamiid adeniin dinukleotiid fosfaat (NADP) ja atsetüülkoensüüm A

(AcCoA). Ühendi tootmiseks vajalike geenide üleekspresseerimine võib paigast viia kofaktorite tasakaalu ja redokspotentsiaali. Kofaktorite vool on raku normaalse talitluse jaoks äärmiselt tähtis, eriti kui rakus toimub aktiivne süntees.

NADPH tase rakus on L- arginiini tootmisel üks peamisi pudelikaelu, sest 1 mooli L-arginiini tootmiseks läheb vaja 3 mooli NADPH-d. NADPH-d toodetakse pentoosfosfaat rajas. Pentoosfosfaadi raja aktiivsust saab suurendada selle raja substraadi, glükoos-6-fosfaadi (G6P), koguse suurendamisega. G6P on substraadiks nii glükolüüsi kui ka pentoosfosfaadi rajas (joonis 3). Glükolüüsi raja teist ensüümi, G6P isomeraasi geeni *pgi* alla reguleerides suureneb G6P vool pentoosfosfaadi ratta ja sünteesitakse rohkem NADPH-d. Selle mutatsiooni järel L-arginiini tiiter suurenes (Park jt., 2014).



Joonis 3. Glükoos-6-fosfaadist (G6P) saab alguse nii glükolüüs, kui ka pentoosfosfaadi rada.

1.3.7. Prekursorite voolu optimeerimine

Prekursoriteks nimetatakse eellasmolekule, millest soovitud produkti sünteesitakse. Süsiniku metabolismiraja vaheproduktist *de novo* metabolismiraja alustamiseks on vaja ka süsiniku voolu muuta. Levinud strateegiad on pudelikaela efektide vältimine ja kõrvaliste metabolismiradade elimineerimine või alla reguleerimine (Lee ja Kim, 2015). Prekursorite voolu toimel tõuseb saagis, ehk söötme süsinik muudetakse efektiivsemalt produktiks.

1.3.7.1. „Lükka-tõmba-blokeeri“ strateegia

Süsiniku voolu optimeerimiseks kasutatakse „lükka-tõmba-blokeeri“ (*push-pull-block*) strateegiat (Hollinshead jt., 2014). Lükka-tõmba-blokeeri strateegiat iseloomustab 1-propanooli tootmise optimeerimine (Choi jt., 2012):

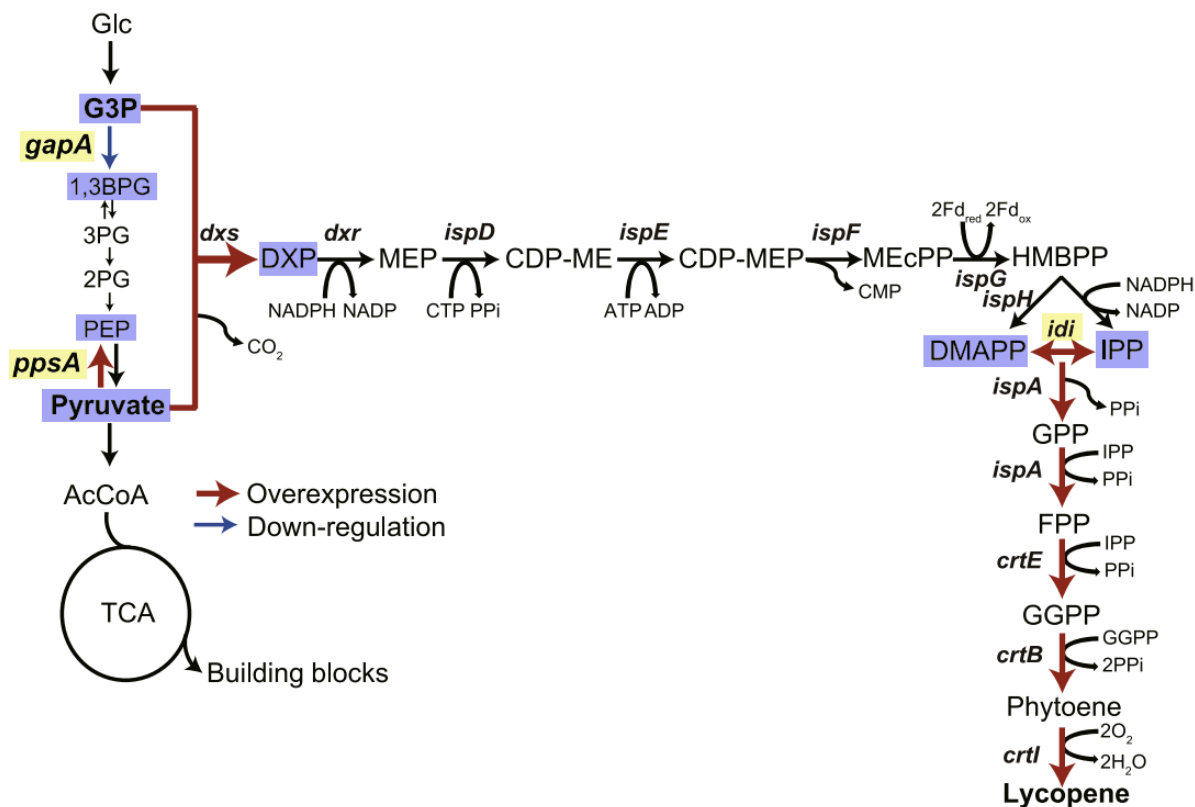
- Lükka- üleekspresseeriti atsetaadi kinaasi ja teisi tsitramalaadi raja ensüüme, et suunata prekursorite voolu propanooli ratta.
- Tõmba- peremeestüvesse sisestati heteroloogne ilma tagasisideta treoniini dehüdrataas, mis sünteesib L-treoniinist 2-ketobutüraati, et suurendada prekursorite kasutamist produkti sünteesimiseks.
- Blokeeri- vaigistati paljude teiste aminohapete metabolismirajad. Sellega vähendati süsiniku voolu mitmetesse konkureerivatesse metabolismiradadesse.

1.3.7.2. Prekursorite voolu optimeerimine lükopeeni näitel

Lükopeeni anabolismis on olulised isopentenüül pürofosfaat (IPP) ja dimetüülallüül pürofosfaat (DMAPP) (joonis 1 A ja B). Nende molekulide tootmiseks *E. colis* on 1-desoksü-D-ksülluloos-5-fosfaadi (DXP), teise nimega MEP, rada. *S. cerevisiaes* ja taimedes sünteesitakse IPP-d ja DMAPP-i melanovaadi (MEV) raja kaudu.

Jung jt. 2016 üritasid oma artiklis suurendada lükopeeni tootlikust *E. colis* DXP raja kaudu, kasutades ratsionaalset disaini. Nad muutsid geenide *gapA* ja *ppsA* ekspressiooni (joonis 4), eeldades, et seeläbi suureneb isoprenoidide prekursori DXP produktsioon ja lükopeeni tootlikus suureneb. Geen *gapA* kodeerib valku glütseeraldehüüd-3-fosfaadi (G3P) dehüdrogenaasi (GAPDH) ja geen *ppsA* kodeerib fosfoenoolpüruvaadi süntaasi (PpsA). Kui geeni *gapA* alla reguleerida, siis kuhjub rakkudes G3P. Kui üle ekspresseerida geeni *ppsA*, konverteeritakse rohkem püruvaati fosfoenoolpüruvaadiks (PEP) ja püruvaadi kogus väheneb (joonis 4). Nende tööst selgus, et isoprenoidide prekursorite süsiniku voolu reguleerimiseks oli *gapA* alla ekspresseerimine 45% edukam, kui *ppsA* üle ekspresseerimine.

Prekursorite IPP ja DMAPPi suhe lükopeeni tootmisel oleks ideaalselt 5:1. IPP ja DMAPP on isomeerid. Isopentenüül difosfaat isomeraas, mida kodeerib geen *idi* (joonis 4), võimaldab lükopeeni prekursorite süsinikuvoo kontrollimist (Kirby ja Keasling, 2009).



Joonis 4. Lükopeeni tootmine *E. coli* (Jung jt., 2016). Tähtsaimad ensüümid on märgitud kollaselt ja tähtsaimad metaboliidid siniselt. Lükopeeni sünteesimise optimeerimiseks reguleeriti alla *gapA* geeni, et glütseeraldehüüdi (G3P) konveteeritaks vähem 1,3- bisfosfoglutseraadiks (1,3BPG). Geeni *ppsA* üle ekspresseeriti, et suurendada püruvaadi voolu tagasi fosfoenoolpüruvaadiks (PEP). Isopentenüül difosfaat isomeraas (*idi*) kontrollob IPP ja DMAPPi tasakaalu.

1.4. Mikroobi kasvatuse protsessid

1.4.1. Söötmed

Söötmed mängivad väga suurt rolli kultuuri kasvamises ja mikroobi füsioloogias. Ideaalne sööde peab sisaldama optimaalsetes kontsentratsioonides kõiki komponente, mis on vajalikud mikroobi kasvuks ja produkti sünteesiks. Laborikatsetes on mõistlik metabolismi uurimiseks kasutada defineeritud söötmeid, näiteks MOPSi-põhist (Neidhardt jt., 1974) söödet. Defineeritud söötmed on aga kallid, seega pakub tööstusele huvi kasutada suuremahulistes protsessides komplekssoötmeid. Komplekssöötmete keemiline koostis pole täpselt defineeritud, sest nad sisaldavad teiste organismide biomassi, näiteks *E. coli* kasvatamiseks laialdaselt kasutatav LB

(*lysogeni broth*) sööde sisaldab pärmi ekstrakti. Komplekssöötmed on odavamad ja seetõttu tööstuslikus mikrobioloogias sagedasti kasutatud (Lee ja Kim, 2015).

Söötme makromolekulide komponentidest on kõige tähtsam süsinikuallikas. Kõige rohkem kasutatud süsinikuallikad tööstuslikus mikrobioloogias on suhkruroo töötlemise jäägid ja maisitärklise hüdroolüsaat, mis sisaldavad glükoosi ja sahharoosi (Lee ja Kim, 2015). Kõige parem on süsinikuallikana kasutada toorainet, mis ei konkureeri inimeste toidulauaga või on mõne tööstusliku protsessi jääkaine.

Paljud mikroobid suudavad 1,3-propaandiooli (1,3PDO) sünteesida, aga söötme maksumus ei tee selle bioloogilist tootmist majanduslikult kasulikuks. (1,3PDO) kasutatakse plastikute, näiteks polüestrite, polüetrite ja polüuretaanide tootmiseks. 1,3PDO-d saab toota toorglütserooli söötmel. Toorglütserool on odav substraat, sest see on biodiisli tootmise jääkaine. Chatzifragkou jt. 2011 sünteesisid 1,3PDO-d ebasteriilse toorglütserooli söötmel bakteritüvega *Clostridium butyricum* VPI 1718. Kui kasvatada kultuuri ebasteriilsetel tingimustel säästetakse raha pideva steriliseerimise ja söötme töötlemise arvelt. Optimeerimiste tulemusel tootsid nad 1,3PDO-d toorglütserooli söötmel tiitriga 67.9g/l ja saagisega 0,55g/g.

1.4.2. Kasvatusprotsessid

Kasvatusprotsessid erinevad substraatide lisamise ja produktide eemaldamise aja ning sageduse poolest. Tööstuslikud bioprotsessid jagatakse traditsiooniliselt:

- 1) *Batch* protsess- Kõige lihtsam tootmisprotsess. Substraadid pannakse reaktorisse vaid üks kord protsessi alguses ja protsessi käigus midagi juurde ei lisata. Protsessi lõppedes eemaldatakse kogu produkt koos biomassiga. *Batch* protsessi kasutatakse lihtsamate tootmisprotsesside, näiteks alkoholi ja orgaaniliste hapete tootmiseks. *Batch* protsessi eelis on lihtsus ja lühike kasvatusaeg, kus mutantide teke ja saastus on ebatõenäolised. See meetod pole tööstuses levinud, sest kultuuri kasvustaadiumit ei ole võimalik kontrollida. Erinevate lühiajaliste tootmispartiide vahel peab reaktori bioprotsessi peatama ja seda desinfitseerima, mille ajal ei saa produkti toota. Erinevate tootmisserieate produktid võivad üksteisest vähesel määral erineda.
- 2) *Fed-batch* protsess- Väga levinud tööstuslikus mikrobioloogias. Protsessi alustatakse väikese söötme kogusega ja lisatakse seda ajapikku juurde. Reaktorist ei eemaldata

produkti ega biomassi enne protsessi lõpetamist. Väikeste söötmekoguste lisamine võimaldab kultuuri statsionaarse faasi aega maksimeerida. Statsionaarses faasis toodavad mikroobid ka kasvuks mittevajalikke sekundaarseid metaboliite, näiteks antibiootikume. *Fed-batch* protsessi käigus töötab kultuur läbi suure koguse suhkrut. Lisatud söötmes saab olla kõrgem suhkru kontsentratsioon, sest reaktorisse jõudes see lahjeneb. Seda meetodit kasutades on võimalik vältida suurtes kontsentratsioonides substraadi toksilisust ja viskoossust. *Fed-batch* protsess vajab tüve põhjalikku uurimist ja protsessi pidevat monitoorimist.

- 3) Pidev (*continuous*) protsess- Protsessi käigus lisatakse reaktorisse substraate ja eemaldatakseprodukte pidevalt. Kultuuri hoitakse eksponentsiaalses kasvufaasis. Seega sünteesivad mikroobid aktiivselt primaarseid metaboliite ja biomass kasvab kiiresti. Pideva protsessi eelis on ühtlane produkti kvaliteet ja protsess kestab pikka aega. Pideva protsessi probleemideks on steriilsuse säilitamine, täpne substraadi ja produktide voolu kiiruse optimeerimine ja väikesed reaktori mahud. Samuti on saadud produkti kontsentratsioon madalam kui *batch* või *fed-batch* protsessi puhul.

1.4.3. Reaktorite mahu suurendamine ehk skaleerimine

1.4.3.1. Optimaalsete tingimuste säilitamine

Katseklaasis optimeeritud tüvi võib suures bioreaktoris käituda teisiti. Raske on hinnata tüve sobivust suuremahulistes protsessides. Katseklaasis optimeeritud bakteritüvega tuleb teha pilootkatsed erinevate suurustega bioreaktoris, liikudes samm-sammult väiksemast mahust suuremasse (Lee ja Kim, 2015). Suurtes bioreaktorites on keeruline tagada võrdset segamist, aeratsiooni, pH-d ja temperatuuri. Laialt kasutusel olevates *fed-batch bubble column reactor* tüüpi bioreaktoris sisestatakse süsiniku allikas ülevalt reaktorisse ja hapnikku pumbatakse reaktori alt. Vähesese segamise tõttu võib tekkida süsiniku-hapniku gradient. See piirab substraadi ja hapniku kättesaamist eri reaktori osades ja võib viia kõrvalproduktide kontsentratsiooni tõusuni (Hollinshead jt., 2014).

Bioreaktori ülevahtamine on mikrobioloogilise produktsiooni puhul kallis. Eelistada võiks protsesse, mis vajaksid võimalikult vähe kõrvalist sekkumist, näiteks aereerimist, steriliseerimist ja puhverdamist. Peremehe valiku peatükis (1.3.1) kirjeldati mitme peremeesorganismi eeliseid bioloogilist sünteesi läbi viies. Näiteks halofiilsed organismid taluvad kõrgemat soolasisaldust ja

pH-d söötmes. Looduslikult happeid tootvad bakterid ja pärmid taluvad reeglina madalamat pH-d. Need peremeeste naturaalsed omadused vähendavad bioreaktori käimashoidmise kulusid.

1.4.3.2. Induktsioonsüsteemid

Tööstuslikus mikrobioloogias on vaja geenide ekspressiooni reguleerida. Laborikatsetes tehakse seda induktorite abil. Induktoriks nimetatakse ainet, mis mõjutab enamasti repressorit või ka aktivaatorit, mistõttu saab kinnitada RNA polümeraas promootorile ning geeni saab ekspresseerida. Laborikatsetes kasutatavad induktorid näiteks isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid (IPTG), L-arabinoos, anhidrotetratsükliin ja kusihape (Liang jt., 2015) on enamasti kallid, mistõttu ei saa neid suuremahulistes bioreaktorites kasutada. Alternatiiv on kasutada temperatuuriga reguleeritavaid promootoreid, kuid suuremahulise bioreaktori temperatuuri muutmine nõuab palju energiat, on aeglane ja võib olla ebaühtlane. Seetõttu ei eelistata temperatuuriga reguleeritavaid promootoreid (Anilionyte jt., 2018).

Bioreaktorites eelistatakse konstitutiivseid või auto-indutseeritud promootoreid, sest neile pole vaja lisada indutseerijaid. Võrreldes kemikaalidega indutseeritud promootoritega on tagatud rakkude ühtlasem geeniekspressioon (Anilionyte jt., 2018). Konstitutiivse promootoriga geeni ekspresseeritakse rakus alati. Biotehnoloogias on näiteks laialt levinud T7 konstitutiivne promootor, kuid see vajab promootorile spetsiifilist T7 faagi polümerasi, mille sünteesi indutseeritakse tavaliselt kemikaalidega. Kui me tahame geeni ekspressiooni kontrollida, oleks ideaalne indutseerija raku enda sünteesitud molekul. Seda nimetatakse auto-indutseerimiseks. Bakterites on naturaalselt mitmeid auto-indutseeritud promootoreid. Osasid neist saab rakendada tööstuslikus mikrobioloogias. Anilionyte jt., 2018 avastasid *E. colist* uue auto-indutseeritud promootori PthrC, millest arendati mutant PthrC3_8. Promootor on indutseeritud madala treoniini taseme korral, ehk varajases eksponentsiaalses kasvufaasis, kus treoniini on rakus vähe. Võrreldes konstitutiivse T7 promootoriga saadi PthrC3_8 promootoriga 2 korda kõrgem kultuuri tihedus ja 1,5 korda suurem ekspressiooni tase, ehk toodeti 3 korda rohkem roheliselt fluoreseeruvat valku *green fluorescent protein* (GFP). Fluoressentsmikroskoobiga tuvastati, et ~100% rakkudest ekspresseerisid GFP-d, seega ekspressioon oli kultuuris väga ühtlane.

1.4.3.3. Mutandid bioreaktoris

Juhuslikud mutatsioonid toimuvad kõigis rakkudes. Tööstuslikule mikrobioloogiale omane rakkude suur metaboolne koormus ja mutantide sagedus tuleneb peamiselt geneetilisest disainist, peremeesorganismi omadustest, kasvutingimustest ja produkti toksilisusest (Rugbjerg ja Sommer, 2019). Defektse tootmisgeeniga mikroobi nimetatakse põgenejaks (*escaper*). Põgenejate peamised tekkepõhjused on mobiilsete elementide vahetumine, aluspaaride asendmine, rekombinatsioon, replikatsiooni libisemine või plasmidi kaotus. Põgenejate kohasus on tootjamikroobidest suurem, sest põgenejate metaboolne koormus on väiksem ja seega on nende kasv kiirem. Põgenejad langetavad kogu kultuuri tiitrit, produktsiooni ja saagist (Rugbjerg ja Sommer, 2019). Põgenejate arvu vähendamiseks on välja töötatud mitmeid strateegiaid.

Mobiilsed elemendid on genoomi alad, mille vahel saab toimuda homoloogne rekombinatsioon RecA valgu abil. Bakteritel on selleks IS ehk *insertion sequence* elemendid ja *S. cerevisiae* Ty elementid. Seega *recA* geeni ja IS või Ty elementide eemaldamise toimet vähenevad mobiilsete elementide ümberkorraldused genoomis ja heteroloogseid geene ekspresseeritakse stabiilsemalt. (Rugbjerg ja Sommer, 2019).

Mutantide tekke vähendamiseks soovitatakse heteroloogsed geenid sisestada genoomi, mitte plasmidi. Plasmidid on kultuurides ebastabiilsed ilma pideva selektsioonita. Selektiooni tagatakse lisades söötmesse antibiootikumi, mille resistentsusgeenid on meile vajalikud plasmidis. Selektioonimeetodid pole aga tööstuslikus mikrobioloogias levinud. Lisaks võiksid olla *knock-out*id täielikud, mitte mõne SNP (*single nucleotide polymorphosis*) põhised, et inaktiveeritud geen tagasi töötavaks versiooniks ei muteeruks (Lee ja Kim, 2015).

Juhuslikud mutatsioonid võivad produktsiooni ka suurendada. Seepärast isoleeritakse mikroobid kõrgemate produktsioonidega bioreaktoritest ja neid kasutatakse järgmiste kultuuride kasvatamiseks (Lee ja Kim, 2015).

1.5. Kasvu ja produktsiooni dilemma

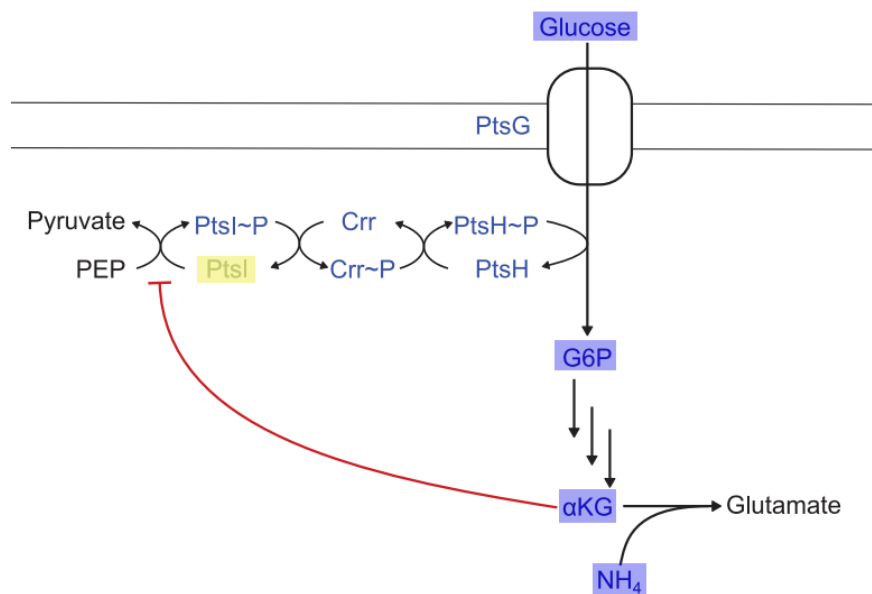
Söötmes olevad substraadid tuleks võimalikult efektiivselt ära kasutada. Substraadid konverteeritakse bioreaktoris kas soovitud produktiks, kõrvalproduktideks või biomassiks. On vaja leida parim bakteri kasvu ja toodetud produkti suhe. Kogu substraati produktiks konverteerida ei saa, sest kultuur peab teatud tiheduseni kasvama. Tööstusliku mikrobioloogia seisukohalt oleks

hea, kui suudetakse kasv ja produktsioon üksteisest lahku lüüa, et neid täpselt ja sõltumatult reguleerida.

Mikroobe võiks vaadata, kui bioloogilise reaktsiooni katalüsaatoreid. Mida rohkem on katalüsaatorit, seda rohkem reaktsioone saab läbi viia. Samas kasutavad mikroobid enda biomassi tootmiseks neid samu söötmes olevaid substraate, mille võiks konverteerida produktiks. Selle dilemma lahenduseks on pakutud välja kahe-staadiumilised protsessid. Esimeses staadiumis kasvab kultuur võimalikult kiiresti ja soovitud aine produktsiooni ei toimu. Soovitud tiheduse saavutades tehakse bakterirakkudes ümberlülitus, mis deaktiveerib raku paljunemisvõime ja aktiveerib soovitud produkti metabolismiraja ensüümide geenid. Kahe-staadiumilise protsessi suurimad väljakutsed on kultuuri ümberlülitamise mehhanismi leidmine ja ümberlülitatud rakkude eluea pikendamine (Burg jt., 2016).

1.5.1. Toitainete limiteerimine

Kultuuri maksimaalse tiheduse reguleerimiseks saab kasutada toitainete limitatsioone, ehk söötmes tekib teatud makro- või mikrotoitainete nälg. Sööttest saab limiteeritud toitainete otsa ja kultuur lõpetab kasvamise ehk jõuab kätte statsionaarne faas. Söötmesse jäävad alles osad substraadid ja nende arvelt saab kultuur produkti edasi sünteesida. Kui aga bakter lõpetab kasvamise, aeglustub või peatub ka metabolism. Ideaalselt võiks kultuuri kasv peatuda, kuid metaboolne aktiivsus jääda samaks või paraneda. Chubukovi jt. 2017 artiklis üritati peatada kultuuri kasv lämmastiku limiteerimisega *E. coli*s. Lämmastiku puudumisel häiritakse ka glükoosi transportahelat (joonis 5). Glutamaati sünteesitakse α -ketoglutaradi (α KG) ja ammoniaagi (NH_4) kombineerimisel. Lämmastiku puudumisel koguneb α KG, mis inhibeerib ensüümi PtsI, mistõttu on häiritud glükolüüsi rada ja glükoosi ei fosforüleerita ja suhkur ei pääse seega rakku. Bakterit modifitseeriti geneetiliselt, üle-ekspressseerides ensüümi PtsI. *Batch* kultuuris limiteeritud lämmastikuga söötmel metaboliseerisid *ptsI* mutandid glükoosi 4 korda kiiremini võrreldes metsiktüüpi rakkudega.



Joonis 5. Lämmastiku regulatsioon glükoosi transpordile. Tähtsamad metaboliidid on märgitud siniselt ja ensüümid kollaselt. Ammoniaagi (NH_4) puudumisel ei kombineerita see α -ketoglutaradiga (α KG) glutamaadiks. α KG inhibeerib ensüümi PtsI, mis takistab lõpuks glükoosi transpordi (Chubukovi jt., 2017)

1.5.2. Sünteetilised meetodid

Kultuuri kasvu ja tootmisfaasi ümberlülituse saab teha ka molekulaarbioloogiliste meetoditega. Idee on peatada bakteri võime paljuneda inhibeerides mingit paljunemiseks vajalikku protsessi samal ajal võimalikult vähe muud metabolismi häirides. Praegusel hetkel on veel vähe töötavaid süsteeme, aga potentsiaalseid kandidaate on palju. Sünteetiliste meetodite eelis on see, et mikroobidel ei pruugi olla ümberlülituse vastast mehhanismi. Seega võiks mikroobi metabolism jääda aktiivseks ka siis, kui jagunemist ei saa läbi viia.

Vaigistatud (*quiescent*) rakkudeks nimetatakse mittejagunevaid, kuid metaboolselt aktiivseid rakke. Vaigistatud rakude eelis nii nälja indutseeritud kui ka statsionaarse faasi ees on aktiivne metabolism. Rowe ja Summers (1999) vaigistasid *E. coli* tüve K-12 derivaatide kultuure indutseerides rakujagunemist reguleerivat väikest RNAd ehk Rcd (*regulator of cell division*). Töö tulemusel valminud tüvi oli mõeldud valgu ekspresseerimiseks plasmiidilt. Rcd indutseeritud vaigistatud rakud töötasid kõige paremini *Histone-like nucleoid structuring protein* (H-NS) mutandis DS941hns-205. H-NS kutsus tavaliselt esile kasvu peatumise, kuid Rcd kasvu peatamine töötas just defektse *H-NS* geeniga mutandis. Optilise tiheduse (OD) 600nm tõus peatus 3 tundi

pärast temperatuuriga indutseerimist, kui see oli jõudnud ~0,3-ni. Valgu ekspressioon jätkus isegi kasvu peatumisel. Indikaatorvalguna kasutati klooramfenikoli atsetüültransferaasi (Cat), mis on klooramfenikooli resistentsusvalk. Vaigistatud ja indutseeritud rakkudes moodustas Cat 40% raku koguvalgust. Mikroskoopia abil tuvastati, et vaid ~25% vaigistatud rakkudest surid, vaigistatud rakud olid 4 korda indutseerimata rakkudest pikemad ja nukleoidid olid kokku pakitud (Rowe ja Summers, 1999).

Williams jt. 2016 kasutasid *S. cerevisiae* kasvu peatamiseks feromoone. Pärmines kutsuvad feromoonid esile paaritumisfaasi, kus raku jagunemine on G1 arestis. Paaritumise faasi omapärane fenotüüp on kompleksne ja vajab veel uurimist. Ometi võib see olla tööstuslikule mikrobioloogiale huvitav tööriist, sest kultuur ei paljune ja glükoosi transport on võrdne eksponentsiaalses faasis oleva kultuuriga, samuti on suurenenud respiratoorne aktiivsus. Autorite sõnul võiks paaritumise fenotüüpi edasi uurida ja feromoonide signaale tagurpidi inseneerida valides ainult mikrobioloogilise produktsiooni osas huvitavad omadused.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Osade molekulide keemiliselt sünteesimine on kulukas ja keskkonnale kahjulik. Kui aga kasutada ainete sünteesimiseks mikroobe, on võimalus vähendada hinda ja mõju keskkonnale. Uusi tüvesid on vaja optimeerida, et need toodaksid piisavalt produkti ning need oleks majanduslikult kasulikud. Erinevate tootmisprotsesside optimeerimiseks on vaja universaalset mudelsüsteemi, mida oleks lihtne mõõta.

Bakalaureusetöö eesmärk oli leida, katsetada ja täiustada spektrofotomeetrilist meetodit bakteriaalse tootmise hindamiseks.

Teine eesmärk oli katsetada väljatöötatud mudelit muudetud toitainete kontsentratsioonidega söötmetel. Selleks mõõdeti *E. coli* bAJ-25 lükopeedi kontsentratsiooni söötmetel, kus kasutati limiteeritud lämmastiku- või fosforiallikat ning suuremat glükoosi kontsentratsiooni.

2.2.Materjalid ja metoodika

2.2.1. Bakteritüved ja plasmiidid

Antud bakalaureusetöös kasutati bakteritüve *Escherichia coli* MG1655 (F⁻ λ⁻ ilvG⁻ rfb-50 rph-1). Bakterisse transformeeriti plasmiid pAC- LYCipi (lisa 1). Edaspidi nimetatakse pAC- LYCipi-ga transformeeritud *E. coli* MG1655 tüve BAJ-25. Plasmiid sisaldas lükopeeni tootmiseks vajalikke gene *crtE*, *crtB* ja *crtI* ning geeni *idi*, mis kodeerib lükopeeni prekursorite IPP ja DMAPPi suhet reguleerivat isopentenüül difosfaadi delta isomeraasi (Kirby ja Keasling, 2009). pAC- LYCipi sisaldab veel klooramfenikooli resistentsusgeeni CAT, mis kodeerib klooramfenikooli atsetüültransferaasi. Replikatsioon algab elemendilt p15A, mis on keskmise koopiaarvuga (20-30) plasmidi replikatsiooni alguspunkt (ori) (Lutz ja Bujard, 1997). Plasmiid oli kingitus Francis X Cunningham Jr labori poolt ja selle leiab addgene kataloogist koodiga 53279.

2.2.2. Kompetentsed rakud ja plasmidi transformatsioon

E. coli MG1655 kompetentseks muutmiseks kasvatati rakud LB vedelsöötme kultuuri optilise tiheduseni OD_{600 nm} = 0,4. 1 ml kultuuri jahutati jääl ja rakud sadestati tsentrifuugides 5 minutit 2500RCF temperatuuril 4°C. Supernatant eemaldati ja rakud pesti 1 ml jääkülma 100mM CaCl₂ lahusega ja võeti üles 100 µl 100mM CaCl₂ lahuses. Rakke hoiti 1 tund jääl.

Plasmidi transformeerimiseks segati jääl kompetentseks tehtud metsiktüüpi *E. coli* MG1655 100ng plasmiidiga pAC- LYCipi. Segu hoiti jääl 15 minutit ja anti kuumashokk temperatuuril 37°C 45 sekundit ja hoiti uuesti jääl 2 minutit. Rakud pandi taastuma ja kasvama 37°C juures 45 minutit raputaval termoplokil eppendorf Thermomixer compact. Rakud tsentrifuugiti 5 minutit 1540 RCF juures. Supernatant eemaldati ja 100 µl sadet plaaditi LB söötmega Petri tassile, millele oli lisatud klooramfenikooli lõppkontsentratsiooniga (25 µg/ml). Petri tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 30°C ja valiti sobiv koloonia. Transformeerimise läbinud kultuur segati glütserooliga lõppkontsentratsioonis 15% ja säilitati -80°C juures edasiseks kasutamiseks.

2.2.3. Söötmed

Katsetes kasutati MOPS põhise söödet (Neidhardt jt., 1974), millele oli lisatud glükoosi 0,3% (w/v). Selektiivsuseks kasutati antibiootikumi klooramfenikool lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml.

Katsetest tulenevalt muudeti osade söötmete glükoosi, NH_4Cl ja K_2HPO_4 kontsentratsiooni. Lämmastiku limitatsiooniga söötmete NH_4Cl lõppkontsentratsioon oli 6,47mM, ehk 68% täissöötmega võrreldes. Fosfori limitatsiooniga söötmete K_2HPO_4 lõppkontsentratsioon oli 0,33mM, ehk 25%.

2.2.4. *E. coli* bAJ-25 tootlikuse mõõtmise katse ülesehitus

Bakteri inokuleeriti 20 ml MOPS põhisesse söötmesse Erlenmeyeri kolvis. Kultuuri kasvatati aeroobsetel tingimustel 30°C juures Sanyo orbital incubator loksutil pöördekiirusega 220 RPM 3 päeva ja võeti proove iga 24 tunni tagant. Proovi võtmist, puhastamist ja hoiustamist on detailselt kirjeldatud töö tulemusena valminud protokollis (peatükk 2.3.2). Bakterikultuuride kasvatamiseks kasutati erinevaid söötmeid, mis olid: 1) MOPS täissööde (sisaldab korrektses koguses kõiki söötme komponente), 2) MOPS lämmastiku limitatsiooniga, 3) MOPS fosfori limitatsiooniga 4) MOPS lämmastiku ja fosfori limitatsiooniga, 5) MOPS söötmed glükoosi kontsentratsioonidega 0,3; 0,45 või 0,6%.

2.2.5. Lükopeeni kontsentratsiooni mõõtmine

Lükopeeni kontsentratsiooni mõõdeti ühe katsetsükli (12 proovi) täitumisel. Selleks inkubeeriti sadet temperatuuril 55°C 250µl atsetoonis 15 minutit pimedas raputaval termoplokil eppendorf Thermomixer compact kiirusega 800RPM. Pärast inkubatsiooni sadestati rakud ja koguti 200µl supernatanti, millest lasti atsetoonil tõmbekapis ära aurata ja kuivanud lükopeen võeti üles 700 µl dimetüül sulfooksiidis (DMSO), millest tehti polüstrüeenist mikrotiiterplaadile lahjendusrida. Detailse protokolliga leiab peatükist 2.3.2.

Lükopeeni kogust hinnati valguse neelduvuse järgi 470 nm juures (Ferreira jt., 2003) kasutades plaadilugejat BioTek SynergyMx.

2.2.6. Ohutusnõuded

Töös kasutatakse atsetooni. Atsetoon on väga tuleohtlik ja kergesti aurustuv kemikaal. Võib põhjustada silmade ärritust, unisust või peapööritust, kahjustab elundeid (PubChem- Acetone). Atsetoon on korrosiivne laialt levinud läbipaistva laboriplastiku, polüstüeeni, suhtes.

2.3. Tulemused

Töös keskenduti bakteriaalse produktsiooni mõõtmise mudelsüsteemi väljatöötamisele ja selle katsetamisele limiteeritud toitainetega söötmetes. Mudelsüsteemi mõõdetav molekul on karoteenide hulka kuuluv lükopeen. Lükopeeni mõõtmist on kirjeldatud ka teiste teadlaste töödes (Jung jt., 2016, Li jt., 2017 ja Cunningham jt., 2007). Käesolevas töös kasutati spektrofotomeetrilist mõõtemetodit. Lükopeen on atraktiivne mudel madalmolekulaarsete ainete tootmise hindamiseks, sest selle mõõtmine ei nõua eriti kulukat laboritehnikat ja lükopeeni tootmiseks peab rakku tranformeerima vaid ühe plasmidi.

2.3.1. Teiste teadlaste kirjeldatud meetodite kasutamine

Esmalt prooviti järgida varemkirjeldatud (Jung jt., 2016, Li jt., 2017) mõõtemetodeid, kuid peatselt selgus, et nende kirjeldatud metoodika järgimine ei viinud usaldusväärsete tulemusteni. Probleeme põhjustas lahustina kasutatav atsetoon, mille keemistemperatuur on 56°C (PubChem-Acetone) ja seega aurustub toatemperatuuril kiiresti. Lisaks on atsetoon polüstrüeeni suhtes korrosiivne. Polüstüeen on laboris laialt kasutatud läbipaistev plastik optilise tiheduse mõõtmiseks, kuid atsetoon muudab selle häguseks ja mõõtetulemused ei ole enam usaldusväärsed. Tulemuste usaldusväärsust hinnati kogu antud töö vältel lahjenduskõverate abil. Lahjenduskõver koosneb erinevate lahjendustega mõõdetud proovide andmete hulgast graafikul. Lineaarses suhtes olevate lahjendusfaktorite kasutamisel peaksid ka mõõdetud andmed olema lineaarses suhtes, seega lahjenduskõverad sirged. Ülalmainitud artiklites kirjeldatud metoodikat kasutades sirgeid lahjenduskõveraids ei saadud ja seega tuli lükopeeni mõõtmismeetodit muuta.

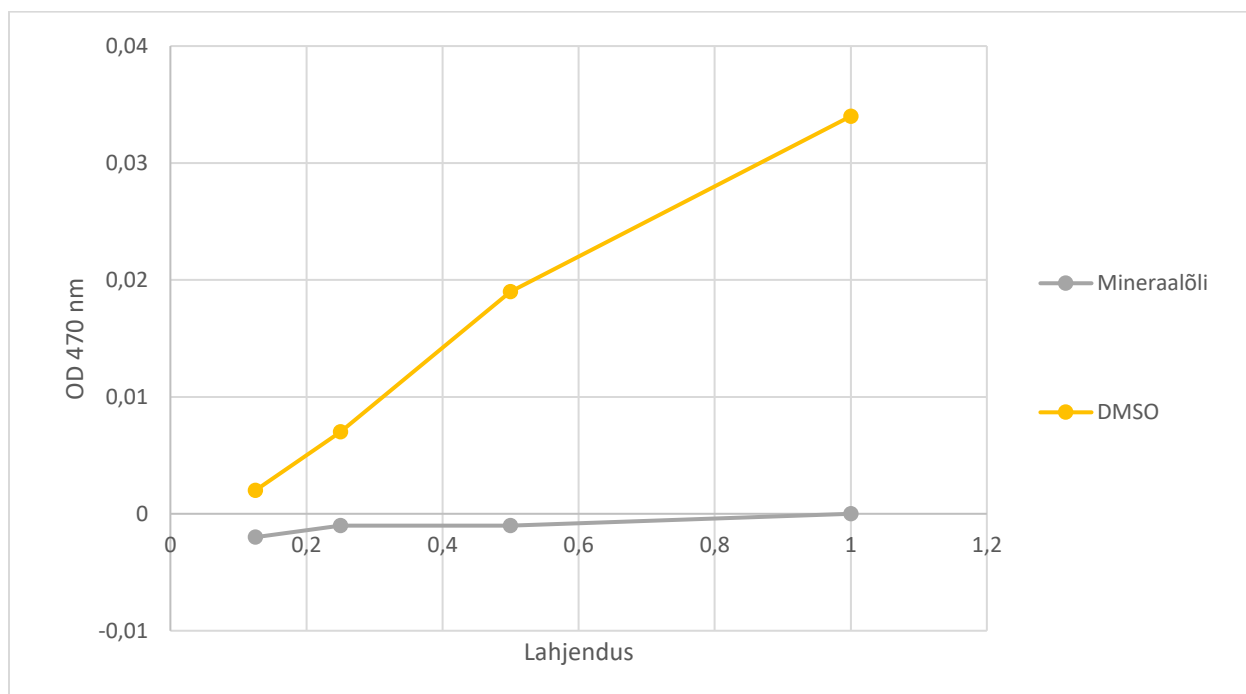
2.3.1.1. Lükopeeni kontsentratsiooni mõõtmine polüpropüleenist 96 kannuga mikrotiiterplaadil

Lükopeeni kontsentratsiooni mõõdeti edaspidi mõõtmisprotsessi hõlbustamiseks 96 kannuga polüpropüleenist mikrotiiterplaadil. Polüpropüleenist plaati kasutati, sest atsetoon on korrosiivne klassikaliselt kasutatava polüstüeeni suhtes ja hägustab silmnähtavalt neelduvuse mõõtmiseks kasutatavat plaati. Polüpropüleenist plaati atsetoon ei hägusta, kuid polüpropüleen neelab ise valgust 470 nm juures. Tühja polüpropüleenist plaadi taustasignaali oli vahemikus 0,139-0,189 (lainepikkusel 470nm), samas kui proovidega täidetud plaadi neeldumised jäid vahemikku 0,141-0,222. Seega oli saadud signaal taustast raskesti eristatav. Lisaks aurustus atsetoon

mikrotiiterplaati täites tõmbekapi all, muutes silmnähtavalt mikrotiiterplaadi kannudes oleva vedeliku taset. Seega otsustati, et atsetooni kasutatakse vaid lükopeeni ekstraheerimiseks. Lükopeeni mõõtmiseks tuleb see mingis muus lahustis lahustada.

2.3.1.2. Lükopeeni lahustite testimine

Lükopeen on hüdrofoobne molekul ja vesilahuses ei lahustu. Järgnevates katsetes kasutati atsetooni vaid lükopeeni ekstraheerimiseks *E. coli* rakkudest. Atsetoonil võimaldati lahtistest tuubidest aurustuda. Kuiva lükopeeni taaslahustamiseks testiti erinevaid lahusteid, mis ei aurustuks kergesti. Esmalt katsetati dimetüül sulfooksiidi (DMSO) ja mineraalõli. Tulemused on toodud joonisel 6.

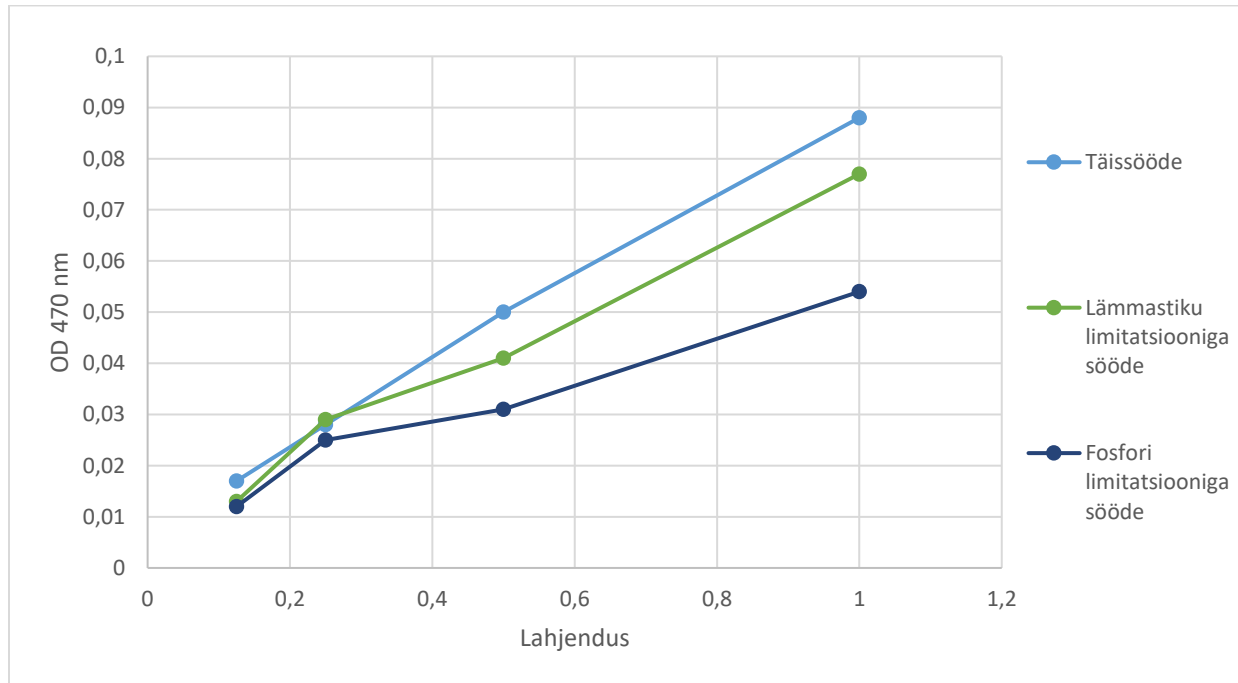


Joonis 6. Lükopeeni lahustumine DMSOs ja mineraalõlis erinevatel detekteeritava proovi lahjendustel. Abtsissel on toodud proovi lahjendused. Esitatud andmed on saadud signaalist taustsignaali (puhta lahusti neeldumise) lahutamisel. Esitatud on ühe katse tulemused.

Lükopeen ei lahustunud mineraalõlis, kuid lahustus hästi DMSOs. DMSO lahjenduskõver oli lineaarne, seega valiti edaspidi lahustiks DMSO. Atsetooni mitte kasutades ei olnud vaja enam kasutada suure taustaneelduvusega polüpropüleenist mikrotiiterplaate ja proovide ruumala ei muutunud juhuslikult, sest DMSO ei aurustu.

2.3.1.3. Lükopeeni tuvastamine madalatel kontsentratsioonidel

Edasises katses mõõdeti lükopeeni kontsentratsiooni 1 ml statsionaarse faasi kultuuri ekstraktist lahjendustel 1; 0,5; 0,25; ja 0,125. Saadud lahjenduskõverad on joonisel 7.

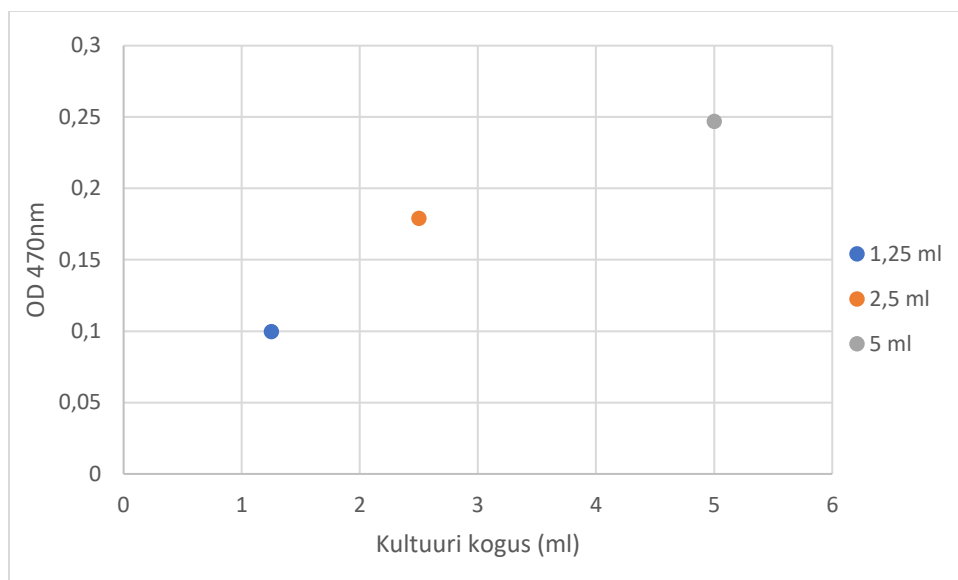


Joonis 7. Lahjenduskõverad 1 ml kultuuri ekstraktist. Abtsissteljel on toodud proovi lahjendus. Lineaarne lahjenduskõver (heledam sinine) ja mittelineaarsed lahjenduskõverad (roheline ja tumesinine). Kõik proovid on võetud 2. päeva ajapunktist. Esitatud on ühe katse tulemused.

Mõned juhuslikud lahjendusread ei olnud lineaarsed, sest madalamatel kontsentratsioonidel saadud signaalid olid taustaga võrreldes ilmselt liiga nõrgad ja mõõdetud signaal erines suurema lahjendusfaktoriga proovide puhul taustast väga vähe. Suure lahjendusfaktoriga proovide tulemuste korrutamisel lahjendusfaktoriga saadi väga erinevad tulemused võrreldes puhta proovi signaaliga. Seega oli vaja signaali tugevamaks muuta, ekstraheerides lükopeeni suuremast kogusest bakteritest.

2.3.1.4. Lükopeeni tuvastamine suuremate ruumaladega proovidest.

Järgmise katse eesmärk oli selgitada, kas on võimalik saada tugevamat signaali, ekstraheerides lükopeeni suuremast kultuuri ruumalast. Probleemiks võib osutuda lahuse küllastumine liiga suure lükopeeni kontsentratsiooni puhul. Testiti 1,25; 2,5 ja 5ml statsionaarse faasi kultuurist ekstraheeritud lükopeeni koguse lahustumist DMSOs (joonis 8).



Joonis 8. Ekstraheeritud kultuuri koguse ja DMSOs lahustunud lükopeeni koguse suhe. Esitatud on ühe katse tulemused.

Selle katse põhjal saab öelda, et 5ml kultuuri ekstraheerimisel ei lahustu kogu lükopeen DMSOs. Katse tulemusena võeti järgnevas katsetes kultuurist 2,5ml suurune proov.

2.3.1.5. DMSO neeldumise mõõtmine suurema ruumala puhul

Testiti ka lahusti (puhta DMSO) neelduvust suuremates kogustes. DMSO neeldumine 470nm juures ei erinenud ruumaladel 150 μ l ja 300 μ l. Seega võis kasutada neelduvuse mõõtmiseks osadest lahjendustest suuremat ruumala. Lahjenduskõveraid tehes kasutati harilikult ruumala 150 μ l, kuna aga solvendi kogus (võrreldes 150 ja 300 μ l) neelduvust ei tõsta, saab mõõta neelduvust ka 300 μ l proovist.

2.3.1.5.1. Lükopeeni lagunemine ajas DMSO suspensioonis valguse käes.

Paljud pigmendid lagunevad ajapikku valguse käes. Teiste tööde põhjal peab lükopeeni ekstraheerima atsetooniga pimedas (Li jt., 2017). Seetõttu testiti lükopeeni lagunemist DMSO suspensioonis mõõtes sama plaati 2 järjestikusel päeval (470nm). Esimesel päeval esines mõõtmistulemusi vahemikus 0,200- 0,047, teisel päeval vahemikus 0,183- 0,048. Erinevatel päevadel mikrotiiterplaadil samadel positsioonidel olnud kannude neelduvus erines väga vähe. Kahte andmehulka võrreldi Studenti T testiga (kahepoolne ja tüüp 1, ehk paarikaupa). Studenti T-

testi tulemuseks saadi $P=1,53 \times 10^{-5}$. Tulemus on standartsest usaldusnivoost $\alpha=0,05$ palju väiksem. Seega ei ole vaja lükopeeni ja DMSO segu 24h jooksul käsitledes pimedas hoida.

2.3.2. Lükopeeni koguse mõõtmise protokoll

Eelnimetatud katsete põhal töötati välja lükopeeni koguse mõõtmise protokoll.

1. Proovi võtmine

- 1.1. Tõsta 1,25ml kultuuri tühja tuubi
- 1.2. Tsentrifuugi tuubi 10700 RCF juures 1 minut ja eemalda supernatant
- 1.3. Lisa sademele juurde 1,25 ml kultuuri
- 1.4. Tsentrifuugi tuubi 10700 RCF juures 1 minut ja eemalda supernatant
- 1.5. Lisa 1,2ml destilleeritud vett, suspendeeri
- 1.6. Tsentrifuugi tuubi 10700 RCF juures 2 minutit ja eemalda supernatant
- 1.7. Lisa 1,2ml destilleeritud vett, suspendeeri põhjalikult või vortexi
- 1.8. Võta suspensioonist 100 μ l kultuuri ja mõõda selle optiline tihedus 600nm juures
- 1.9. Tõsta täpselt 1 ml punktis 1.7 tehtud suspensiooni uude tuubi
- 1.10. Tsentrifuugi uut tuubi 10700 RCF juures 2 minutit ja eemalda supernatant
- 1.11. Hoiusta proove temperatuuril -20°C

2. Lükopeeni ekstraheerimine

- 2.1. Lisa proovile tõmbekapis 250 μ l atsetooni
- 2.2. Vortexi tuube 10 sekundit
- 2.3. Inkubeeri liikaval termoplokil temperatuuril 55°C 15 minutit pimedas kiirusega 800 RPM
- 2.4. Tsentrifuugi tuube 10700 RCF juures 10 minutit
- 2.5. Tõsta 200 μ l supernatanti tõmbekapi all ettevaatlikult uude tuubi
- 2.6. Lase atsetoonil ära aurustuda, hoides tuube avatud korgiga tõmbekapi all vähemalt 6h või kuni tuubi põhjas vedeliku tilku näha pole
- 2.7. Tõsta kuiva lükopeeni tuubi 700 μ l DMSOt, vortexi 10 sekundit
- 2.8. Pane tuubid loksutavale tuubihoidjale üleöö
- 2.9. Jätkamisel jälgi, et tuubi põhjas ei oleks kuivanud punast rõngast, vaid et kogu sade oleks ühtlaselt lahustunud

3. Lükopeeni koguse mõõtmine

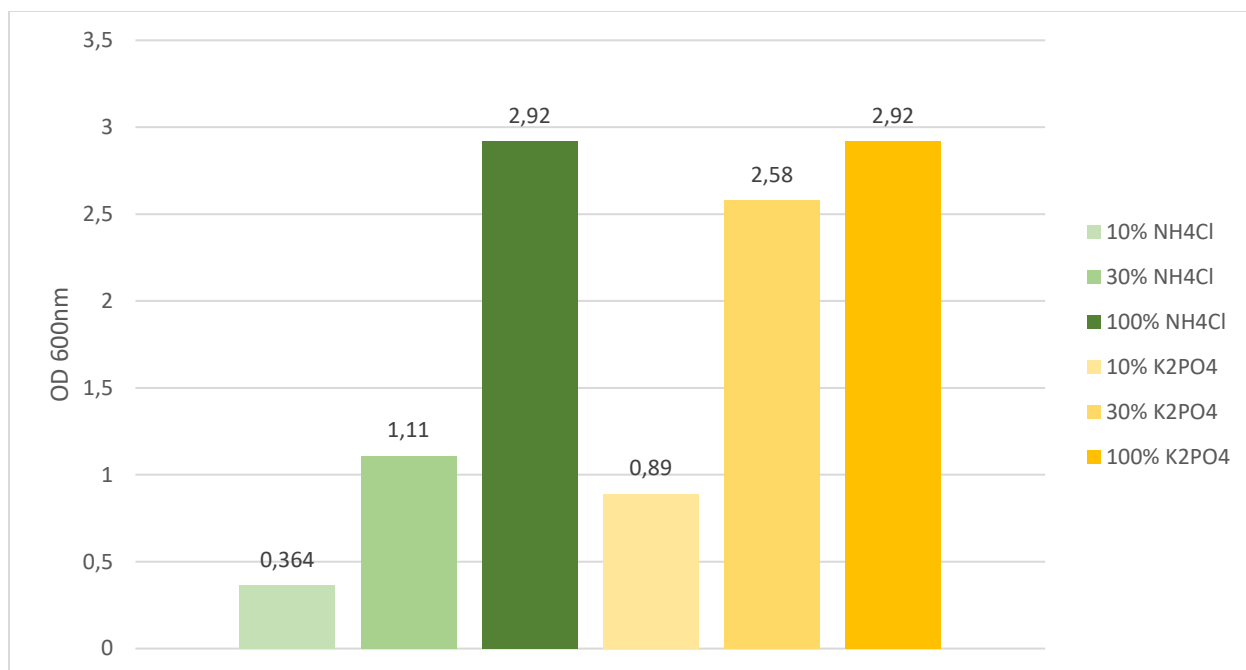
- 3.1. Võta polüstüreenist lamedapõhjaline mikrotiiterplaat

- 3.2. Pane proov mikrotiiterplaadile, ühe proovi jaoks läheb vaja 4 kannu. Tee proovist lahjendusrida. Esimesse kannu pane 300µl puhast ekstrakti, teise 150µl puhast ekstrakti, kolmandasse 150µl 2 korda DMSOs lahjendatud ekstrakti ja neljandasse 300µl 4 korda DMSOs lahjendatud ekstrakti
- 3.3. Sisesta proovid plaadilugemismasinasse, kus plaati loksutatakse 30 sekundit keskmisel kiirusel ja mõõdetakse valguse neelduvust 470nm juures

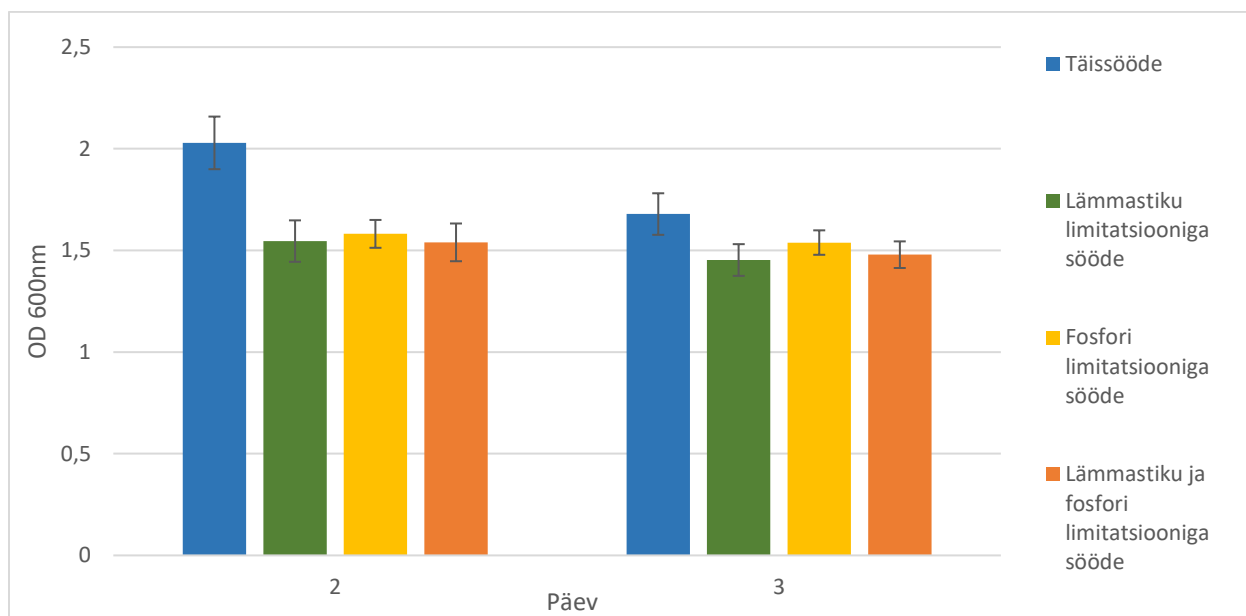
2.3.3. Kasvutingimuste optimeerimine

Söötmetest rohkema produkti, ehk suurema saagise, saamiseks peab toitaineid efektiivselt ära kasutama. Üks strateegia on peatada kultuuri kasv, et konverteerida rohkem toitaineid produktiks, mitte biomassiks. Töö eesmärk oli uurida, kas lämmastiku või fosforiallika lõppemisel peatunud kasvuga *E. coli* bAJ-25 suudab toota rohkem lükopeeni biomassi kohta, kui täissöötme kasvades.

Kasvu peatamiseks oli vaja selgitada millistel lämmastiku ja fosfori allika kontsentratsioonidel peatub kasv kultuuri tihedusel ~70% võrreldes täissöötmega. Selleks kasvatati *E. coli* bAJ-25 erinevatel NH_4Cl ja K_2HPO_4 kontsentratsioonidel ja mõõdeti kultuuride optilist tihedust. Tulemused on toodud joonisel 9. Saadud tulemuste põhjal hinnati, et kasvu peatamiseks ~70% maksimaalsest tihedusest tuleb kasutada NH_4Cl lõppkontsentratsiooniga 6,47mM ehk 68% ja K_2HPO_4 lõppkontsentratsiooniga 0,33mM ehk 25% täissöötme kogusest. Seda hüpoteesi testiti kasutades lükopeeni tootvat *E. coli* tüve bAJ-25. Eksperimentaalsed tulemused näitavad, et selliste NH_4Cl ja K_2HPO_4 kontsentratsioonide puhul jääb kultuuride lõpptihedus tõepoolest ~70% peale täissöötmega võrreldes (joonis 10).



Joonis 9. *E. coli* MG1655 kasvamine NH₄Cl ja K₂HPO₄ vaestel söötmetel. Protsentides on esitatud NH₄Cl ja K₂HPO₄ kontentratsioonid võrreldes täissöötmega. Esitatud on 2. päeva tulemused. Esitatud on ühe katse andmed.



Joonis 10. *E. coli* bAJ-25 kasvamine NH₄Cl ja K₂HPO₄ vaestel söötmetel. Esitatud on 2. ja 3. päeva tulemused, kus kultuurid on saavutanud maksimaalse tiheduse. Lämmastiku limitatsiooniga sööde tähendab NH₄Cl lõppkontsentratsiooni 6,47mM ja fosfori limitatsiooniga sööde tähendab K₂HPO₄ lõppkontsentratsiooni 0,33mM. Esitatud on 4 katse keskmine koos standardhälvetega.

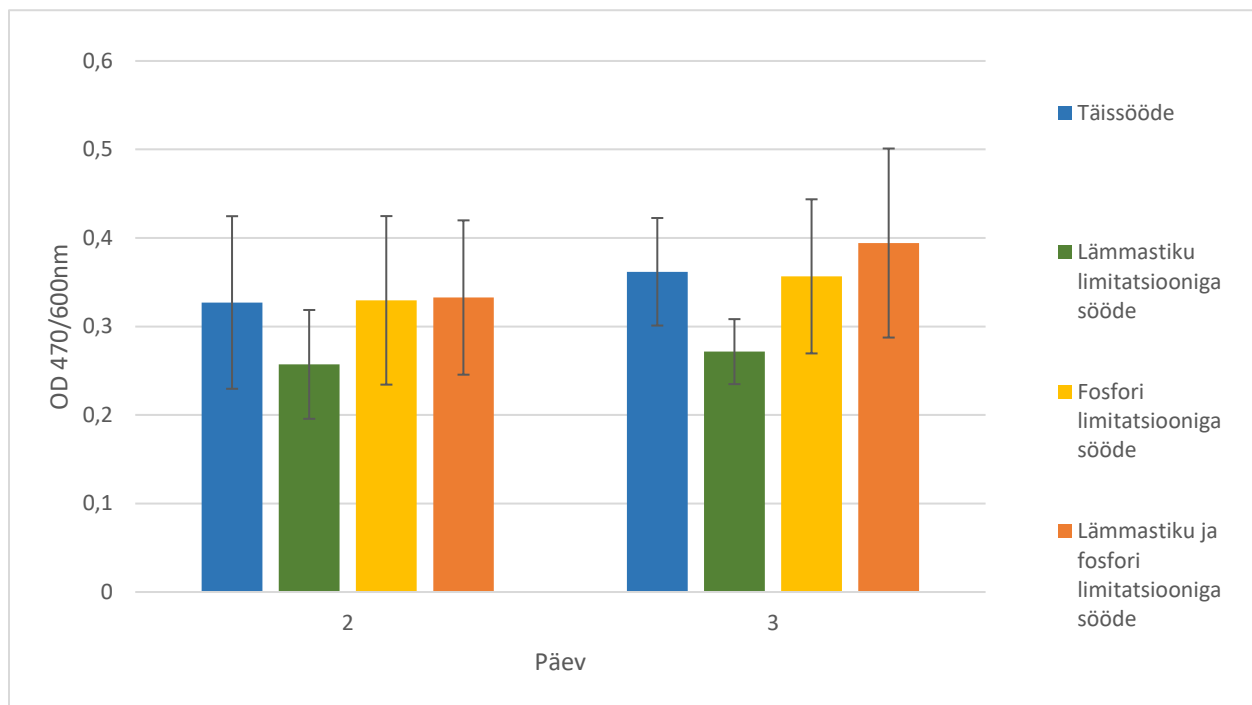
2.3.4. Lükopeeni taseme mõõtmised erinevatel toitainete kontsentratsioonidel

2.3.4.1. Lükopeeni kontsentratsiooni hindamine lämmastiku ja fosfori limiteerimisel

Lükopeeni taseme mõõtmise optimeerimise ja kasvu peatamiseks vaja mineva lämmastiku- ja fosforiallika kontsentratsiooni väljaselgitamise järel sai liikuda edasi peamise uurimisküsimuse juurde: Kas enneaegne kasvu peatumine toob kaasa suurema lükopeeni produktsiooni biomassi kohta? Selleks kasvatati *E. coli* bAJ-25 peatükis 2.3.3. välja selgitatud kontsentratsioonidega söötmetel ja lükopeeni mõõdeti vastavalt peatükis 2.3.2. välja toodud protokollile.

2.3.4.2. Lükopeeni kontsentratsioon biomassi kohta limitatsiooniga söötmetel

Uuriti kultuuride lükopeeni tootmist rakumassi kohta. Mõõdeti lükopeeni neelduvuse ja kultuuri optilise tiheduse suhet (OD 470/ 600nm). Kokku tehti 4 usaldusväärsete tulemustega katseseeriat. Tulemused on toodud joonisel 11.

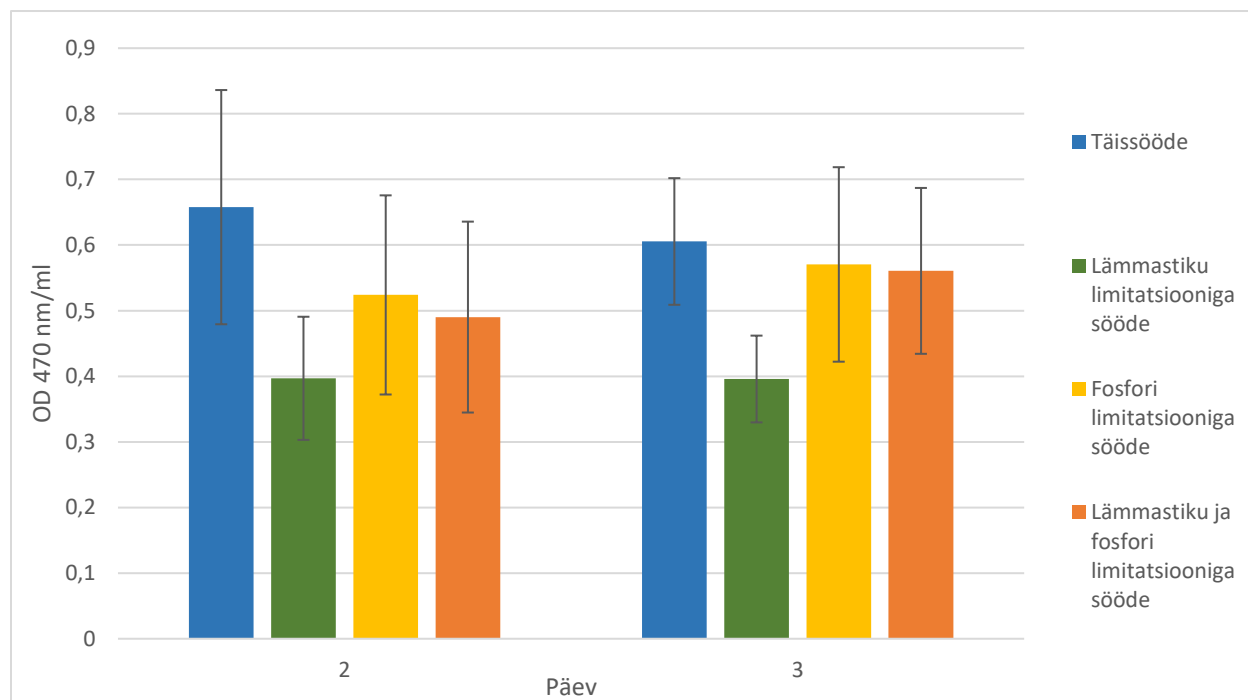


Joonis 11. Lükopeeni produktsioon biomassi kohta. Esitatud on 2. ja 3. päeva tulemused, kus kultuurid on saavutanud maksimaalse tiheduse. Lämmastiku limitatsiooniga sööde tähendab NH_4Cl lõppkontsentratsiooni 6,47mM ja fosfori limitatsiooniga sööde tähendab K_2HPO_4 lõppkontsentratsiooni 0,33mM. Esitatud on 4 katse keskmine koos standardhälvetega.

Lükopeeni kontsentratsioon kultuuri tiheduse kohta ei suurenenud limiteeritud toitainetega söötmetes. Lämmastiku ja fosfori liitnäljas oli kultuuri omadused sarnased fosforinäljas kultuuriga. Ainult lämmastikunäljas kultuurid tootsid vähem lükopeeni kultuuri tiheduse kohta.

2.3.4.3. Lükopeeni tiiter limitatsioonidega söötmetel

Mõõdeti ka lükopeeni tiitrit. Tiiter tähendab mõõdetava ühendi massi ruumala kohta. Antud töös kasutati tiitri ühikuna OD470nm/ml. Tulemused on näha joonisel 12.

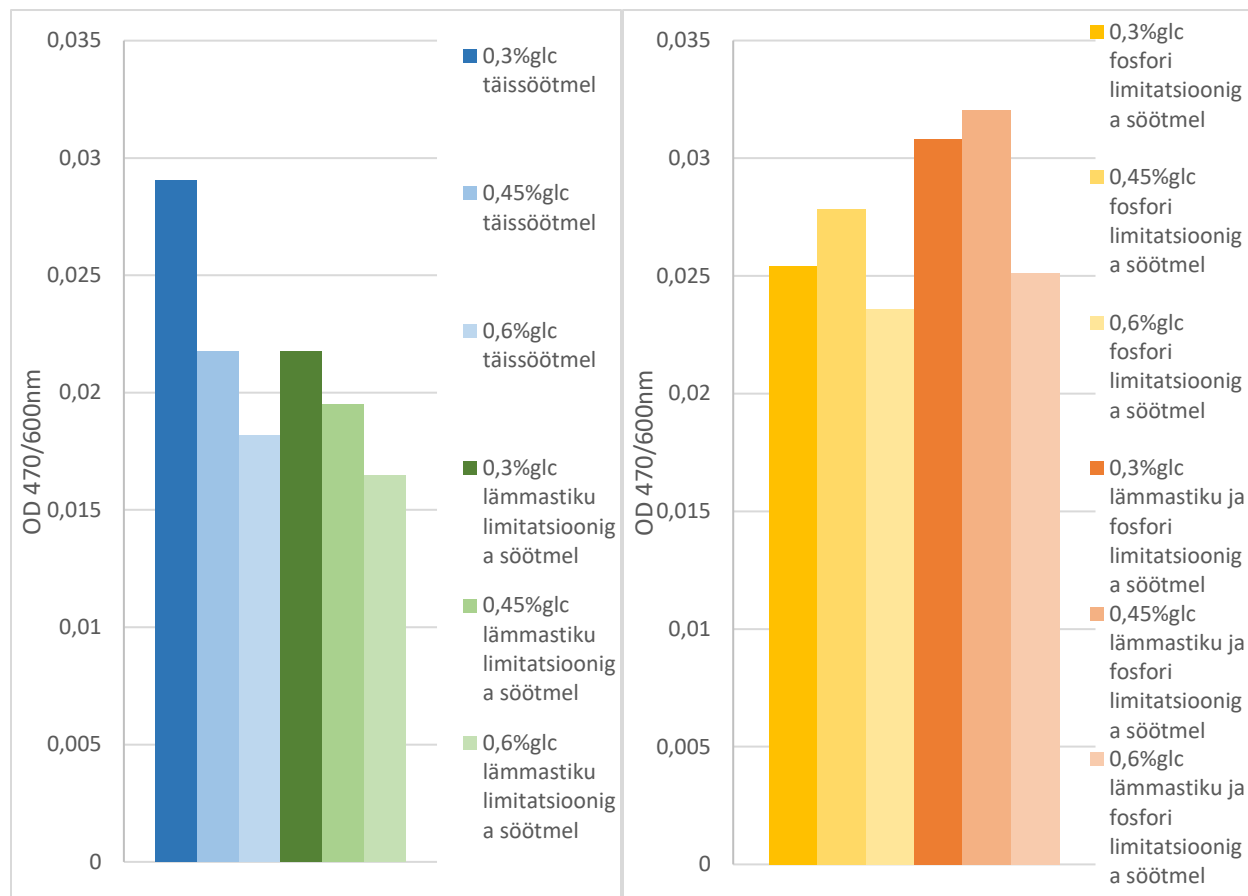


Joonis 12. Lükopeeni tiiter limiteeritud toitainetega söötmetel. Tiitri ühikuks on OD 470nm/ml. Esitatud on 2. ja 3. päeva andmed, kui kultuurid olid saavutanud maksimaalse tiheduse. Lämmastiku limitatsiooniga sööde tähendab NH_4Cl lõppkontsentratsiooni 6,47mM ja fosfori limitatsiooniga sööde tähendab K_2HPO_4 lõppkontsentratsiooni 0,33mM. Esitatud on 4 katse keskmine koos standardhälvetega.

Tiitrite tulemused olid sarnased lükopeeni produktsiooniga biomassi kohta (joonis 11). 3. päevaks ei suurenenud lükopeeni tiiter limiteeritud toitainetega söötmetes. Ainult lämmastikunäljas kultuurid olid madalama tiitriga.

2.3.5. Lükopeeni produktsiooni hindamine glükoosi ülekülluses

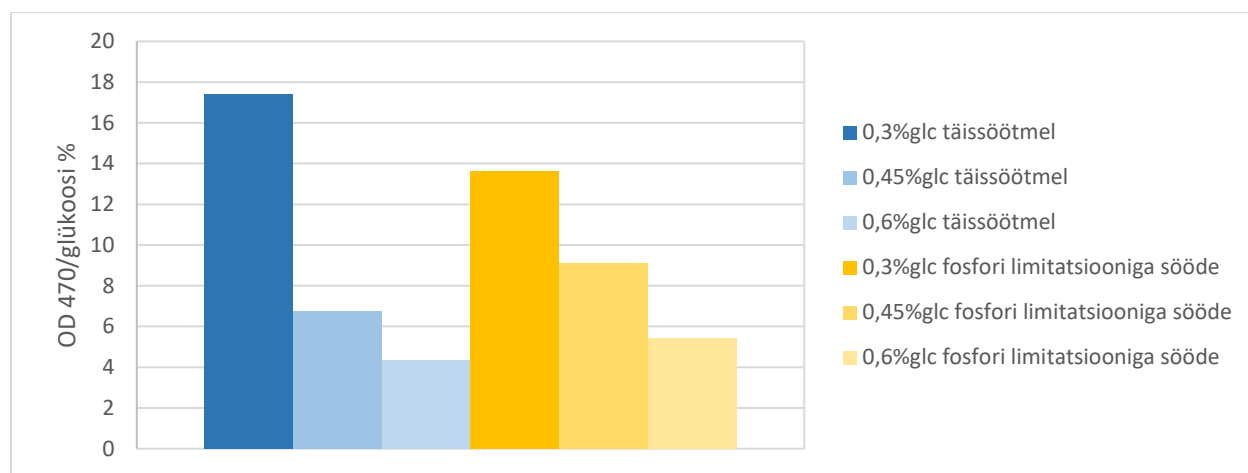
Lükopeeni produktsiooni uurimiseks testiti ka glükoosi külluse mõju rakkudele. Katse eesmärk oli selgitada, kas glükoosi külluses toodetakse rohkem lükopeeni biomassi kohta. Erinevates proovides kasutati glükoosisisaldust 0,3% (standardne täissööde), 0,45% ja 0,6% (w/v) kui ka madalamaid lämmastiku- ja fosforiallika kontsentratsioone. Proovidel leiti lükopeeni kontsentratsiooni ja biomassi suhe. Tulemusued on toodud joonisel 13.



Joonis 13. Lükopeeni kontsentratsioon biomassi kohta suurematel glükoosi kontsentratsioonidel. Vasakpoolses tulpdiagrammis on kokku pandud täissöötmete ja lämmastiku limitatsiooniga söötmete andmed. Parempoolses tulpdiagrammis on kokku pandud fosfori ning lämmastiku ja fosfori limitatsiooniga söötmete andmed. Lämmastiku limitatsiooniga sööde tähendab NH_4Cl lõppkontsentratsiooni 6,47mM ja fosfori limitatsiooniga sööde tähendab K_2HPO_4 lõppkontsentratsiooni 0,33mM. Joonisel on märgitud 2 päeva kasvanud kultuuri andmed. Esitatud on ühe katse tulemused.

Katsest saab järeldada, et glükoosi lisamine ei suurenda lükopeeni kontsentratsiooni biomassi kohta lämmastiku limitatsiooniga söötmel. Kui aga kultuuril esineb fosfori või lämmastiku ja fosfori nälg, siis lükopeeni kontsentratsioon oluliselt ei erine täissöötmega võrreldes.

Sama katse tulemuste põhjal arvutati ka lükopeeni saagis (*yield*) suurendatud glükoosi kogusetel. Saagis tähendab mõõdetava molekuli kontsentratsiooni võrreldes substraadi algse kontsentratsiooniga, ehk kui efektiivselt substraat produktiks konverteeriti. Tulemused on toodud joonisel 14.

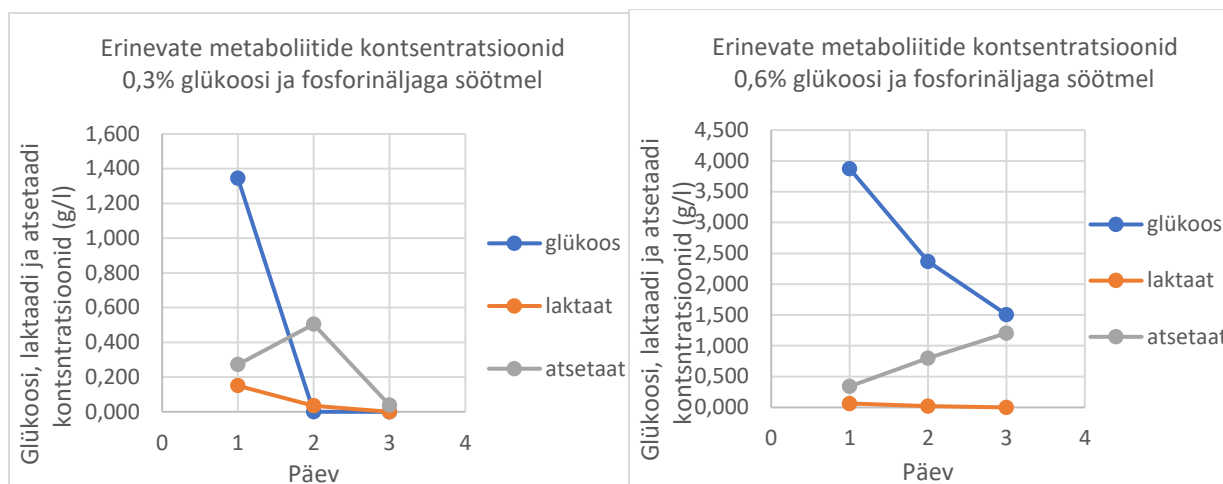


Joonis 14. Lükopeeni saagis suurematel glükoosi kontsentratsioonidel. Näidatud on vaid täissöötmed ja fosfori limitatsiooniga kasvanud kultuuride andmed, kuid ka teised tulemused olid sarnased. Fosfori limitatsiooniga sööde tähendab K_2HPO_4 lõppkontsentratsiooni 0,33mM. Joonisel on märgitud 2 päeva kasvanud kultuurist mõõdetud tulemused. Esitatud on ühe katse tulemused.

Katse näitas, et glükoosi lisamine vähendab saagist.

2.3.5.1. Glükoosi ja teiste metaboliitide analüüs

Eelmisest katsest jäi püsima küsimus, mis saab söötmes olevast glükoosist? Kui palju seda söötmesse alles jääb ja milliseid metaboliite sellest toodetakse? *E. coli* toodab suhkrust kõrvalproduktidena erinevaid orgaanilisi happeid (kõige rohkem atsetaati). Nende mõõtmiseks analüüsiti metaboliite kõrgsurvevedelikkrommatograafia (HPLC *high pressure liquid chromatography*) abil. HPLC provide mõõtmise ja analüüsi viis läbi Tobias Butelmann. Mõõta sai vaid detektsioonipiirist üle olnud glükoosi, laktaati ja atsetaati. Mõned väljavõtted tulemustest on toodud joonisel 15.



Joonis 15. Metaboliitide kontsentratsioonid fosfori limitatsiooniga söötmel. Vasakpoolse graafiku andmed on saadud 0,3% glükoosi söötmel ja parema andmed 0,6% glükoosi söötmel. Esitatud on ühe katse tulemused.

0,3% glükoosi söötmel tarbiti glükoos ära teiseks päevaks, atsetaati toodeti maksimaalselt teiseks päevaks ja kolmandaks päevaks langes atsetaadi kontsentratsioon. 0,6% glükoosi söötmel jäi söötmesse glükoosi alles ka kolmandaks päevaks ja atsetaadi kontsentratsioon kasvas iga päevaga.

2.4. Arutelu

Tööstuslikus mikrobioloogias tegeletakse mikroobitüvede loomisega, mis kasutavad taastuvaid süsinikuallikaid. Mikroobid toodavad erinevaidprodukte, mis on praeguseni suuresti toodetud naftakeemia abil. Arendusprotsessi oluline osa on optimeerimine, sest ainult majanduslikult tasuvad protsessid jõuavad päriselt kasutusse. Üritatakse luua mikroobitüvesid, mis järjest efektiivsemalt muudaksid võimalikult odava söötme kasulikuks produktiks. Substraadist produktini jõudmiseks on palju protsesse, mida saab optimeerida: rakkude ainevahetus, fermentatsiooniprotsessi ülesehitus, söötme koostis ja produkti puhastamine. Ainevahetuse insenerid tegelevad pidevalt uute mikroobitüvede ratsionaalse disaini ja nende optimaalsete kasvutingimuste selgitamisega.

Antud töö eesmärk oli selgitada kas *Escherichia coli* tootlikust on võimalik suurendada peatades bakterite kasvu enne, kui kogu süsinikuallikas söötme otsa saab. Selle testimiseks töötati esmalt välja lükopeenil tootmisel põhinev mudelsüsteem.

Lükopeen sobib mudelsüsteemiks, sest selle kasutamiseks ei ole vaja teha *E. colis* arvukaid geneetilisi manipulatsioone. Piisab, kui transformeerida *E. colisse* vaid üks plasmidi, mis kodeerib 4 ensüümi (Cunningham jt., 2007). Lükopeedi kontsentratsiooni saab mõõta spektrofotomeetriselt, mis on suhteliselt lihtne ja odav detekteerimise viis.

Selgus, et varem kirjeldatud lükopeedi kontsentratsiooni mõõtmise meetod (Jung jt., 2016, Li jt., 2017) ei ole reprodutseeruv ning olemasolevate protokollide järgimine ei andnud usaldusväärseid andmeid. Peamine probleemide allikas oli lükopeedi lahustina kasutatud atsetoon, mis on korrosiivne laialt levinud läbipaistva laboriplastiku (polüstüreen) suhtes. Lisaks aurab atsetoon väga kiiresti. Juba lahust valmistades muutub ruumala atsetooni auramise arvelt ja segu kontsentratsioon tõuseb, andes tugevama signaali. Selles töös kasutatud mõõtmisprotsessile oli unikaalne kultuurist ekstraheeritud lükopeedi lahustamine DMSOs. Mõõdetud tulemuste hindamiseks kasutati lahjenduskõvera, mille lineaarsuse põhjal sai kinnitada andmete usaldusväärsust.

Tööstusliku mikrobioloogia huvides on substraate võimalikult efektiivselt ära kasutada. Substraadidest toodavad rakud nii biomassi kui ka produkte. Tööstusele on oluline sünteesida võimalikult palju produkti ja selle tootmisel võimalikult vähe biomassi. Biomassi koguse

vähendamiseks tuleb kultuuri kasv mingil hetkel peatada. Kasvu peatudes aeglustub aga enamasti ka metabolism ja soovitud produkti sünteesitakse kokkuvõttes vähem. Ideaalne oleks leida meetod, kuidas peatada kultuuri kasv, kuid jätta aktiivseks metabolism. Antud töö põhiline küsimus oli, kas kultuuri kasvu peatamine lämmastiku või fosforiallika lõppemisel suurendab saadud produkti hulka, kui produkt koosneb vaid süsinikust ja vesinikust. Selle testimiseks kasutati kultuuri kasvu peatamiseks madalamate lämmastiku- ja fosforiallika kontsentratsioonidega söötmeid.

Söötmetes kasutatud toitainete kontsentratsiooni reguleeriti tasemele, kus kultuuri kasv peatuks ~70% täissöötmega võrreldes. Peatunud kasvuga kultuuris peaks olema alles veel kasutamata glükoos, mida saaks lükopeeni konverteerida. Lükopeeni kontsentratsiooni siiski suurendada ei suudetud. Tõenäoliselt läksid rakud lämmastiku- ja fosforiallika söötmetest lõppemisel statsionaarsesse faasi ja nende metabolism aeglustus. Kuigi lükopeen koosneb vaid süsinikust ja vesinikust, on kogu raku ainevahetus väga tugevalt mõjutatud ka lämmastiku ja fosfori kontsentratsioonide poolt.

Lämmastik on tähtis aminohapete ja nukleiinhapete koostisosa. Antud töös oli lämmastiku limitatsiooniga kultuurides madalam lükopeeni kontsentratsioon. Selle põhjus oli ilmselt, et lämmastiku kontsentratsiooni langemisel peatub glükoosi transportahel. Chubukov jt., 2017 artiklis suudeti geeni *PtsI* üle-ekspresseerides suurendada lämmastikunäljas bakterite produktsiooni. *PtsI* reguleerib mikroobi lämmastiku ja süsiniku tasakaalu. Antud töös aga geneetilisi modifikatsioone bakteritüves läbi ei viidud. Seega lämmastikuallika lõppedes ei ole oluline kui palju glükoosi on söötmes, kui seda ei transpordita rakku.

Fosfor on rakus tähtis osa paljudest biomolekulidest ja mängib suurt rolli signaalide ülekandmisel fosforüleerimise näol. Fosfori limitatsiooniga (10% võrreldes täissöötmega) M9 söötmes kirjeldati bakteris *E. coli* BW25113 suuremat glükoosi tarbimist ja asetaadi produktsiooni (Marzan ja Shimizu, 2011). Lisaks väideti artiklis, et fosfori ja lämmastiku regulatsioon on omavahel tihedalt seotud *RpoS*, *RpoD* ja *Pho* geenidega. Antud töös oli fosfori limitatsiooniga kultuurides täissöötmega sarnane lükopeeni kontsentratsioon.

Katsete tulemusel selgus, et kasvatades *E. coli* bAJ-25 limiteeritud lämmastiku- või fosforiallikaga söötmel ei suurene lükopeeni kontsentratsioon arvutatuna biomassi kohta, ega kultuuri ruumala kohta. Lükopeeni kontsentratsioon ei suurenenud ka täissöötmetest suurema glükoosi kontsentratsiooniga söötmetel, kus rakud ei tarbi ära kogu glükoosi.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti, kas *E. coli* tootlikust on võimalik suurendada peatades bakterite kasvu enne, kui kogu süsinikuallikas söötimest ära tarbitakse. Eelduse kohaselt jääb söötmesse alles glükoosi, mida rakk saaks kasutada edasiseks produkti tootmiseks.

Selle testimiseks loodi lükopeeni tootev *E. coli* tüvi nimega bAJ-25. Lükopeeni kontsentratsiooni mõõtmiseks töötati välja usaldusväärne protokoll ja kasutati seda *E. coli* bAJ-25 tootlikuse hindamiseks.

Mikroorganismide produktide sünteesi suurendamiseks on võimalik kasutada väga erinevaid meetodeid. Mikrobioloogilise produktsiooni optimeerimiseks võib valida peremeesorganismi, suurendada tolerantsi, eemaldada negatiivset regulatsiooni, suunata prekursorite ja kofaktorite voolu, muuta söötme koostist, valida bioreaktori tüüp, reguleerida kultuuri kasvu ja palju muud.

Kasvu reguleerimiseks kasutati lämmastiku- või fosforiallika limitatsiooniga ning suurendatud glükoosi kontsentratsiooniga söötmeid. Kuigi lükopeen ei koosne lämmastikust ega fosforist, on neil elementidel oluline roll üldises raku funktsioneerimises. Antud töös neid kontrollmehanismid ei elimineeritud, mistõttu läksid kultuurid statsionaarsesse faasi ja metabolism aeglustus. Üheski limiteeritud söötmes ei saavutatud täissöötmega võrreldes suuremat lükopeeni kontsentratsiooni.

SUMMARY

The aim of this thesis was to find out, whether the production of *E. coli* can be increased by modifying the medium to stop the growth before carbon limitation occurs. Leftover carbon could be used to synthesise larger quantities of the desired product.

In order to test that, a new *E. coli* strain called bAJ-25 was created. A trustworthy protocol was made to measure the concentration of lycopene in *E. coli*.

There are many ways to increase the synthesis of microorganisms. In order to optimise the production one could select a host organism, increase product tolerance, remove negative feedback, direct the flow of precursors and cofactors, change medium composition, select bioreactor type, controll the growth of the culture and much more.

In order to regulate the growth of the cultures, nitrogen- or phosphorus-limited or glucose-enriched media was used. Despite that the lycopene is not consisting of nitrogen or phosphorus, these elements play an important role in overall functionality of the cell. In this thesis the controlmechanisms were not knocked out. Beacuse of that, the cells went into a stationary phase and their metabolism slowed down. Comaparing to the full media, the lycopene concentration did not increase in any of the nutrient limited media.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Anilionyte, O., Liang, H., Ma, X., Yang, L., Zhou, K. (2018). Short, auto-inducible promoters for well-controlled protein expression in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(16): 7007-7015.
- Borodina, I., Kildegaard, K. R., ... Nielsen, J. (2015). Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via β -alanine. *Metabolic Engineering*. 27: 57-64.
- Burg, J. M., Cooper, C. B., Ye, Z., Reed, B. R., Moreb, E. A., Lynch, M. D. (2016). Large-scale bioprocess competitiveness: the potential of dynamic metabolic control in two-stage fermentations. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 14: 121-136.
- Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E., Zeng, A. P. (2011). Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(1): 101-112.
- Choi, Y. J., Park, J. H., Kim, T. Y., Lee, S. Y. (2012). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1-propanol. *Metabolic Engineering*. 14(5): 477-486.
- Chubukov, V., Desmarais, J. J., Wang, G., Chan, L. J. G., Daidoo, E. EK., Petzold, C. J., Keasling, J. D., Mukhopadhyay, A. (2017). Engineering glucose metabolism of *Escherichia coli* under nitrogen starvation. *npj Systems Biology and Applications*. 3: 16035.
- Cunningham, FX Jr., Lee, H., Gantt, E. (2007). Carotenoid biosynthesis in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eukaryot Cell*. Mar;6(3):533-45.
- Etschmann, M. M. W., Schrader, J. (2006). An aqueous–organic two-phase bioprocess for efficient production of the natural aroma chemicals 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate with yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(4): 440-443.
- Ferreira, ALA., Yeum, K., Russell, RM., Krinsky, NI., Tang, G. (2003). Enzymatic and oxidative metabolites of lycopene. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 14: 531-540.

- Hadadi, N., Hatzimanikatis, V. (2015). Design of computational retrobiosynthesis tools for the design of de novo synthetic pathways. *Current Opinion in Chemical Biology*. 28: 99-104.
- Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*. 104: 155-172.
- Hollinshead, W., He, L., Tang, Y. (2014). Biofuel production: an odyssey from metabolic engineering to fermentation scale-up. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-8.
- Jung, J., Lim, J. H., Kim, S. Y., Im, D. K., Lee, S. J. V., Oh, M. K., Jung, G. Y. (2016). Precise precursor rebalancing for isoprenoids production by fine control of gapA expression in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 38: 401-408.
- Kirby, J., Keasling, J.D. (2009). Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 335-355.
- Lee, S. Y., Kim, H. U. (2015). Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nature biotechnology*. 33: 1061-1072.
- Li, Q., Fan, F., Gao, X., Yang, C., Bi, C., Tang, J., Liu, T., Zhang, X. (2017). Balanced activation of IspG and IspH to eliminate MEP intermediate accumulation and improve isoprenoids production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 44: 13-21.
- Liang, C., Xiong, D., Zhang, Y., Mu, S., Tang, S. Y. (2015). Development of a novel uric-acid-responsive regulatory system in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(5): 2267-2275.
- Lutz, R., Bujard, B. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research*. 25(6): 1203-1210.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., Smith, D. F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria. *Journal of Bacteriology*. 199(3): 736-747.
- Park, S. H., Kim, H. U., Kim, T. Y., Park, J. S., Kim, S. S., Lee, S. Y. (2014). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nature Communications*. 5(1): 1-9.

- Pfefferle, W., Möckel, B., Bathe, B., Marx, A. (2003). Biotechnological Manufacture of Lysine. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 79: 61-112.
- Rowe, D. C. D., Summers, D. K. (1999). The Quiescent-Cell Expression System for Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6): 2710-2715.
- Rugbjerg, P., Sommer, M. O. A. (2019). Overcoming genetic heterogeneity in industrial fermentations. *Nature Biotechnology*. 37(8): 869-876.
- Stark, D., Münch, T., Sonnleitner, B., Marison, W., Stockar, U. (2002). Extractive Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*. 18(3): 514-523.
- Zhuang, K., Herrgård, M. J. (2015). Multi-scale Exploration of the Technical, Economic, and Environmental Dimensions of Bio-based Chemical Production. *Metabolic Engineering*. 31: 1-12.
- Tan, D., Wu, Q., Chen, J. C., Chen, G. Q. (2014). Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*. 26: 34-47.
- Tan, D., Xue, Y. S., Aibaidula, G., Chen, G. Q. (2011). Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresource Technology*. 102(17): 8139-8136.
- Tan, Z., Khakbaz, P., Chen, Y., Lombardo, J., Yoon, J. M., Shanks, J. V., Klauda, J. B., Jarboe, L. R. (2017). Engineering *Escherichia coli* membrane phospholipid head distribution improves tolerance and production of biorenewables. *Metabolic Engineering*. 44: 1-12.
- Williams, T. C., Peng, B., Vickers, C. E., Nielsen, L. K. (2016). The *Saccharomyces cerevisiae* pheromone-response is a metabolically active stationary phase for bio-production. *Metabolic Engineering Communications*. 3: 142-152.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

PubChem- Acetone

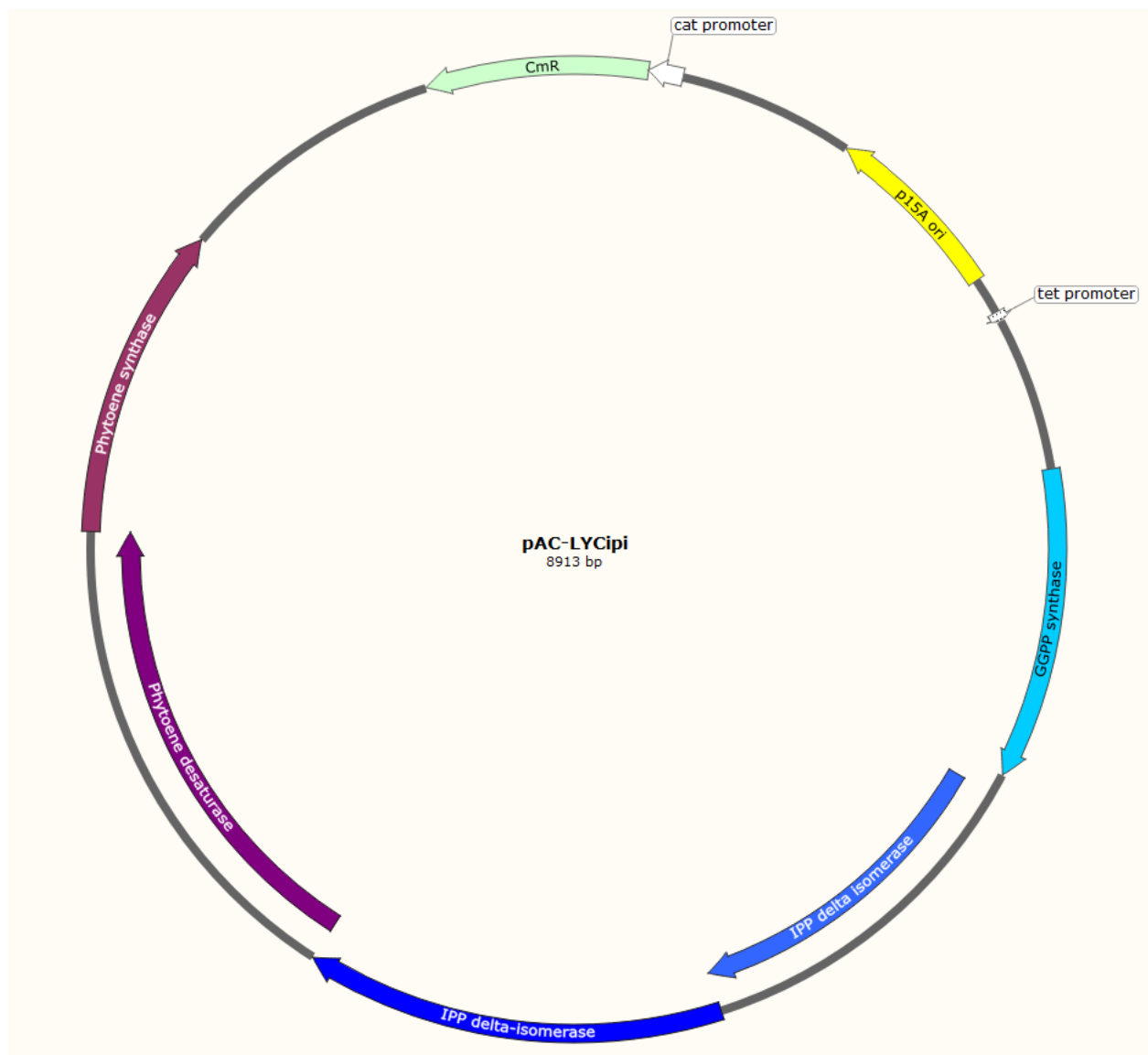
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/180#section=Safety-and-Hazards>

(külastamise

kuupäev 31.05.2020)

LISAD

Lisa 1. plasmiid pAC- LYCipi



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Koit Kõrgnurm,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose *Escherichia coli* **produktiooni mõõtmine limiteeritud toitainetega söötmetel**, mille juhendaja on Arvi Jõers, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Koit Kõrgnurm

03.06.2020